

LAPORAN AKHIR PENELITIAN BOPTN



PENGARUH KUERSETIN TERHADAP KADAR VERY LOW DENSITY LIPOPROTEIN SERUM DAN EKSPRESI LIPOPROTEIN LIPASE PADA JARINGAN OTOT RANGKA TIKUS MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2

OLEH

1. SYLVIA RIANISSA PUTRI(KETUA)

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BENGKULU
TAHUN 2013**

HALAMAN PENGESAHAN

1. JUDUL PENELITIAN : Pengaruh kuersetin terhadap kadar *very low density lipoprotein* serum dan ekspresi lipoprotein lipase pada jaringan otot rangka tikus model diabetes melitus tipe 2
2. BIDANG PENELITIAN : Kesehatan
3. KETUA PENELITIAN
 - a. Nama Lengkap : dr. Sylvia Rianissa Putri, MSc
 - b. Jenis Kelamin : P
 - c. NIP : 198512202009122002
 - d. Disiplin Ilmu : Kesehatan
 - e. Pangkat/Golongan : Penata Muda Tk. 1/III B
 - f. Jabatan : Asisten Ahli
 - g. Prodi : Pendidikan Dokter
 - h. Fakultas : Kedokteran
 - i. Alamat Rumah : Jl. Budi Utomo No. 24, Beringin Raya
 - j. Telepon/Fax/Email : 081311480788/sylvia.r.putri@gmail.com
 - k. Alamat Kantor : Jl. WR. Supratman Kandang Limun
 - l. Telepon/Fax/Email : 0736349733/pspdunib@gmail.com
4. Jumlah Anggota Peneliti : -
5. Lokasi Penelitian : FK UGM
6. Jumlah Biaya Yang Diusulkan : Rp 10.000.000,00

Mengetahui/Menyetujui
Ketua Pengelola Pendidikan Dokter



(Dr. Sumpono, MSi)

Yogyakarta, November 2013

Ketua Peneliti



(dr. Sylvia Rianissa Putri, MSc)

Menyetujui
Ketua Lembaga Penelitian



Drs. Sarwit Sarwono, M.Hum
NIP 19581112498603 1 002

Abstrak

Latar belakang. Defisiensi kerja insulin di jaringan target pada diabetes melitus (DM) dapat menyebabkan dislipidemia diabetikum dalam jangka panjang, salah satunya dimediasi oleh lipoprotein lipase (LPL). Salah satu senyawa alam yang diketahui dapat mempengaruhi profil lipid darah adalah kuersetin. Kuersetin diketahui dapat menurunkan kadar trigliserida dan kolesterol total serum pada hewan coba. *Very low density lipoprotein* (VLDL) merupakan kolesterol yang mengandung kadar trigliserida yang tinggi dan dihidrolisis oleh enzim yang sama, yaitu LPL. Karena itulah diteliti apakah kuersetin dapat mempengaruhi kadar VLDL dan apakah efek tersebut dimediasi oleh LPL.

Tujuan Penelitian. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek kuersetin terhadap kadar VLDL serum dan ekspresi LPL pada jaringan otot rangka tikus Wistar model DM tipe 2.

Metode. Penelitian ini menggunakan desain kuasi-eksperimental *post test only control group*. Tikus Wistar yang dibagi dalam 9 kelompok dengan dosis perlakuan berbeda. Setelah 4 minggu perlakuan, kadar VLDL serum diperiksa, kemudian tikus dieutanasia dan *m. soleus* diambil untuk diperiksa ekspresi LPL dengan metode ELISA.

Hasil Penelitian. Lima dari 7 kelompok DM yang mendapat perlakuan memiliki kadar VLDL serum yang lebih rendah dari kelompok DM yang mendapat plasebo, dengan 3 kelompok memiliki kadar VLDL serum yang lebih rendah dari kelompok normal yang mendapat plasebo, yaitu kelompok yang mendapat kuersetin 80 mg/kgBB, kelompok kombinasi kuersetin 5 mg/kgBB-glibenklamid, dan kelompok kombinasi kuersetin 80 mg/kgBB-glibenklamid. Kelompok kuersetin 20 mg/kgBB dengan atau tanpa kombinasi glibenklamid memiliki kadar VLDL yang lebih tinggi dari kelompok DM. Di antara kelompok DM, kadar LPL tertinggi ditemukan pada kelompok glibenklamid 5 mg/kgBB, sedangkan kadar terendah ditemukan pada kelompok kuersetin 5 mg/kgBB. Tidak terdapat perbedaan kadar VLDL serum dan ekspresi LPL di jaringan otot rangka yang signifikan antar kelompok perlakuan. Korelasi antara kadar VLDL serum dan ekspresi LPL di jaringan otot rangka setelah 4 minggu perlakuan lemah dan tidak bermakna.

Kesimpulan. Pemberian kuersetin tidak mempengaruhi kadar VLDL serum. Pemberian kuersetin dapat meningkatkan ekspresi LPL di jaringan otot rangka. Kadar VLDL serum tidak berkorelasi dengan ekspresi LPL di jaringan otot rangka setelah 4 minggu perlakuan.

Kata kunci: kuersetin, VLDL, ekspresi LPL jaringan otot rangka, DM tipe 2.

Abstract

Background. Defect of insulin action in target organs can ultimately lead to diabetic dyslipidemia. This is affected by lipoprotein lipase (LPL). A natural compound that is considered affecting lipid profile is quercetin. Quercetin lowers serum triglyceride and total cholesterol of animal models. Very low density lipoprotein is a type of cholesterol with high triglyceride content and hydrolyzed by the same enzyme which hydrolyzes triglyceride, i.e. LPL. Thus, it is essential to conduct a study on lipoprotein lipase (LPL) role as an important triglyceride hydrolase in accordance to quercetin effects on lowering VLDL level.

Objective. This research was conducted to study quercetin effects on serum VLDL and skeletal muscle LPL expression levels in type 2 DM rat models.

Methods. Using quasi-experimental post test only control group design, male Wistar rats were grouped into 9 groups of various treatment dosages and treated for 4 weeks. Following 4 weeks of treatment, blood from each rat was collected and serum VLDL level was examined. Rats were then sacrificed and *m. soleus* from each rat was harvested for LPL ELISA.

Results. Five groups of DM rats had lower VLDL level than DM placebo group, with 3 groups even had lower VLDL level than normal placebo group, i.e. quercetin 80 mg/kgBW, glibenclamide-5 mg/kgBW quercetin, and glibenclamide-80 mg/kgBW quercetin. Both 20 mg/kgBW quercetin (with or without glibenclamide) had higher VLDL level than DM placebo group. Among DM groups, the highest LPL level was found in glibenclamide only group while the lowest was in 5 mg/kgBW quercetin group. There was no significant difference on serum VLDL and skeletal muscle expression levels among groups. Correlation of serum VLDL and skeletal muscle expression levels was weak and insignificant.

Conclusions. These findings suggest that selected treatment dosages couldn't affect serum VLDL level but these dosages could enhance skeletal muscle LPL expression levels. Serum VLDL and skeletal muscle expression levels after 4 weeks of treatment were not correlated.

Keywords: quercetin, VLDL, skeletal muscle LPL expression, type 2 DM.

Daftar Isi

Halaman judul	i
Halaman pengesahan	ii
Abstrak	iii
Abstract	iv
Daftar isi	v
Daftar tabel	vi
Daftar gambar	vii
Bab 1. Pendahuluan	1
Bab 2. Perumusan Masalah	4
Bab 3. Tinjauan Pustaka	5
Bab 4. Tujuan Penelitian	23
Bab 5. Metode Penelitian	24
Bab 6. Jadwal Pelaksanaan	34
Bab 7. Hasil Penelitian	35
Bab 8. Pembahasan	40
Bab 9. Kesimpulan dan Saran	46
Bab 10. Personalia Penelitian	47
Bab 11. Anggaran Biaya Penelitian	48
Daftar Pustaka	49

Daftar Tabel

Tabel 1. Beberapa gen yang diregulasi oleh insulin.	8
Tabel 2. Efek insulin terhadap glukosa darah.	10
Tabel 3. Kandungan kuersetin pada bahan makanan tertentu.	19
Tabel 4. Konsentrasi kuersetin di jaringan tikus setelah pemberian kuersetin selama 11 minggu.	20
Tabel 5. Jadwal penelitian.	34
Tabel 6. Berat badan sebelum dan setelah perlakuan.	36
Tabel 7. Rerata asupan pakan harian hewan coba selama 4 minggu masa perlakuan.	36
Tabel 8. Kadar glukosa darah puasa sebelum dan setelah perlakuan.	37
Tabel 9. Kadar <i>very low density lipoprotein</i> serum setelah perlakuan.	38
Tabel 10. Kadar LPL <i>m. soleus</i> setelah perlakuan.	38
Tabel 11. Uji korelasi kadar VLDL serum dan kadar LPL.	39

Daftar Gambar

Gambar 1. Jalur transduksi sinyal insulin dalam meregulasi glikogen sintase.	8
Gambar 2. Regulasi metabolisme oleh insulin.	9
Gambar 3. Struktur kimia obat golongan sulfonilurea.	13
Gambar 4. Transpor kolesterol antar jaringan pada manusia.	14
Gambar 5. Struktur kuersetin.	18
Gambar 6. Kerangka teori.	21
Gambar 7. Kerangka konsep penelitian.	22
Gambar 8. Alur penelitian.	38

Bab 1. Pendahuluan

Diabetes melitus (DM) merupakan salah satu penyakit kronik yang paling sering ditemukan di seluruh dunia dengan jumlah kasus yang terus meningkat. Prevalensi DM pada kelompok usia 20-79 diperkirakan akan meningkat menjadi 7,7% atau sekitar 439 juta jiwa di seluruh dunia pada tahun 2030 (Shaw *et al.*, 2010).

Diabetes melitus merupakan penyakit multifaktorial dan ditandai dengan hiperglikemia (WHO, 2011; Cockram, 2000). Patogenesis penyakit ini bervariasi dari kerusakan sel β pankreas akibat proses autoimun yang menyebabkan defisiensi insulin hingga abnormalitas yang menyebabkan resistansi kerja insulin (ADA, 2012). Berdasarkan patogenesisnya, terdapat empat tipe DM, dengan tipe tersering adalah DM tipe 2 (90-95%), yaitu DM yang ditandai dengan resistansi dan defisiensi insulin relatif atau defek sekresi insulin (Dean and McEntyre, 2004; ADA, 2012).

Pada DM dapat ditemukan abnormalitas ketiga metabolisme makronutrien akibat defisiensi kerja insulin di jaringan target (ADA, 2012). Abnormalitas metabolisme lipid yang ditemukan adalah peningkatan triasilgliserol (TAG) dan penurunan HDL. Pada jangka panjang, abnormalitas ini menyebabkan dislipidemia diabetikum, ditandai dengan hipertrigliseridemia dan penurunan kadar kolesterol HDL (*high density lipoprotein*) pada DM yang tidak terkontrol. Pada DM tipe 2 juga dapat ditemukan kolesterol *small dense* LDL (*low density lipoprotein*), yaitu kolesterol LDL yang dikonversi menjadi ukuran yang lebih kecil dan kemungkinan lebih aterogenik (Goldberg, 2001).

Dislipidemia diabetikum pada DM tipe 2 biasanya tidak terkoreksi dengan sempurna bahkan dengan kontrol glikemik yang baik (Goldberg, 2001), yang dilakukan melalui perubahan gaya hidup maupun dengan bantuan obat-obatan. Salah satu obat hipoglikemik oral golongan pemicu sekresi insulin kelas sulfonilurea yang umum digunakan adalah glibenklamid. Penelitian Fondjo *et al.* (2012) menunjukkan pemberian glibenklamid 5 mg/kg berat badan selama 6 minggu pada tikus DM dapat menurunkan kadar TAG, kolesterol total, dan kolesterol LDL secara signifikan. Penelitian ini juga menunjukkan glibenklamid dapat meningkatkan kadar kolesterol HDL secara signifikan, namun penelitian Mughal *et al.* (1999) pada manusia tidak menunjukkan hasil yang sama. Pemberian glibenklamid pada pasien DM tipe 2 selama 12 minggu dapat meningkatkan kadar kolesterol HDL secara signifikan walaupun belum mencapai kadar normal, sedangkan kadar TAG, kolesterol total, LDL, dan *very low density lipoprotein* (VLDL) tidak mengalami penurunan yang signifikan.

Dislipidemia diabetikum dipengaruhi oleh berbagai faktor, yaitu efek insulin pada produksi apoprotein hepar, regulasi lipoprotein lipase (LPL), kerja protein transfer kolesterol ester (*cholesteryl ester transfer protein*, CETP), dan kerja insulin di adiposa

dan otot (Goldberg, 2001). Lipoprotein lipase memegang peranan penting dalam metabolisme dan transpor lipid (Wang and Eckel, 2009), yaitu menghidrolisis TAG dari kilomikron dan kolesterol VLDL sehingga menyebabkan hilangnya sebagian besar kandungan TAG pada kilomikron dan kolesterol VLDL (Murray *et al.*, 2009).

Lipoprotein lipase diekspresikan oleh jaringan ekstrahepatik, terutama otot jantung, otot rangka, dan adiposa, kemudian ditranspor ke endotel kapiler jaringan-jaringan tersebut (Wang and Eckel, 2009; Kovář *et al.*, 2004). Penelitian Tavangar *et al.* (1992) tentang regulasi LPL pada tikus DM menunjukkan bahwa pada DM ditemukan penurunan aktivitas LPL di jaringan adiposa epididimis dan otot jantung, namun tidak ditemukan efek yang sama pada ginjal dan otak.

Dislipidemia secara umum diterapi dengan menggunakan obat-obatan yang mempengaruhi metabolisme lipid. Saat ini senyawa alam juga telah banyak diteliti untuk penatalaksanaan dislipidemia. Salah satu senyawa alam yang dipercaya dapat mempengaruhi metabolisme lipid adalah kuersetin, suatu senyawa flavonoid polifenol yang banyak ditemukan dalam buah, sayur, teh, dan *wine* (Kleemaan *et al.*, 2011; Aguirre *et al.*, 2011). Berbagai penelitian menunjukkan kuersetin menyebabkan penurunan kadar kolesterol plasma tikus; penurunan kadar TAG dan kolesterol serum kelinci yang mendapat diet tinggi lemak; penurunan kadar TAG plasma dan kolesterol total serta peningkatan kolesterol HDL pada mencit DM tipe 2 *db/db*; dan perbaikan steatohepatitis non alkoholik yang diinduksi diet tinggi lemak pada tikus gurun (Ying *et al.*, 2013; Juźwiak *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2012).

Penelitian DM dengan hewan coba dapat dilakukan dengan menggunakan hewan model DM spontan atau yang diinduksi, salah satunya adalah menginduksi DM dengan *streptozotocin* (STZ). *Streptozotocin* adalah antibiotik yang dihasilkan oleh *Streptomyces achromogenes*. Senyawa ini memiliki efek sitotoksik selektif sel β pankreas karena transpornya ke dalam sel dimediasi oleh *glucose transporter 2* (GLUT2) (Conn, 2008; Hosokawa *et al.*, 2001). *Streptozotocin* menyebabkan sitotoksitas melalui alkilasi DNA dan pembentukan radikal bebas selama metabolisme STZ (Bennet and Pegg, 1981; Bolzan and Bianchi, 2002). Kombinasi STZ dan nikotinamida adalah salah satu metode untuk menginduksi DM tipe 2. Kelebihan nikotinamida menyebabkan peningkatan kadar *N1*-metilnikotinamida, suatu metabolit nikotinamida, sehingga menyebabkan peningkatan stres oksidatif yang dimediasi perubahan rasio NAD^+/NADH sehingga menyebabkan resistansi insulin dan hiperglikemia (Zhou *et al.*, 2009).

Berdasarkan penelitian terdahulu mengenai efek kuersetin terhadap profil lipid serum, maka akan diteliti apakah kuersetin memiliki efek terhadap kadar kolesterol VLDL dan apakah efek tersebut dimediasi oleh LPL sebagai enzim yang berperan penting dalam hidrolisis TAG. Efek pemberian kuersetin terhadap ekspresi LPL akan dilihat pada

jaringan otot rangka tikus Wistar model DM tipe 2 yang diinduksi dengan STZ dan nikotinamida. Jaringan otot rangka dipilih karena merupakan jaringan yang sensitif insulin, termasuk jaringan utama yang mengekspresikan LPL, dan merupakan jaringan yang dapat memanfaatkan lemak sebagai sumber energi (Devlin, 2006; Murray *et al.*, 2009; Pykälistö *et al.*, 1975). Tikus Wistar dipilih sebagai hewan model karena memiliki karakteristik yang mirip dengan manusia, salah satunya dapat mengekspresikan LPL.

Bab 2. Perumusan Masalah

Dari uraian latar belakang di atas, maka diajukan rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimanakah pengaruh pemberian kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kg berat badan (BB), kombinasi kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB, glibenklamid 5 mg/kgBB, dan plasebo terhadap kadar *very low density lipoprotein* (VLDL) serum tikus Wistar model DM tipe 2?
2. Bagaimanakah pengaruh pemberian kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB, kombinasi kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB, glibenklamid 5 mg/kgBB, dan plasebo terhadap ekspresi LPL di jaringan otot rangka tikus Wistar model DM tipe 2?
3. Apakah terdapat hubungan antara kadar VLDL serum dan ekspresi LPL di jaringan otot rangka tikus Wistar model DM tipe 2 setelah pemberian kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB, kombinasi kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB, dan glibenklamid 5 mg/kgBB?

Bab 3. Tinjauan Pustaka

3.1. Diabetes Melitus

Diabetes melitus (DM) merupakan sekumpulan penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia akibat gangguan produksi, gangguan kerja insulin, atau keduanya (ADA, 2012; Fauci *et al.*, 2008). Walaupun DM berbagai penelitian terkait penatalaksanaan DM telah dilakukan, namun prevalensinya terus meningkat. Peningkatan ini terutama diakibatkan oleh peningkatan prevalensi DM tipe 2 akibat meningkatnya obesitas dan penurunan aktivitas fisik terkait industrialisasi (Conn, 2008; Fauci *et al.*, 2008). Penelitian yang dilakukan oleh Shaw *et al.* (2010) memperkirakan prevalensi DM di seluruh dunia pada kelompok usia 20-79 tahun akan mengalami peningkatan dari 6,4% pada tahun 2010 menjadi 7,7% pada tahun 2030. Dalam rentang waktu yang sama, jumlah penderita DM berusia dewasa di dunia akan meningkat lebih dari 50%, negara berkembang akan mengalami peningkatan sebesar 69% dan negara maju akan mengalami peningkatan sebesar 20%.

Di Indonesia, prevalensi nasional penyakit DM berdasarkan diagnosis tenaga kesehatan dan gejala adalah 1,1%. Data pada studi yang sama juga menunjukkan prevalensi DM berdasarkan hasil pengukuran glukosa darah pada penduduk berusia > 15 tahun di daerah perkotaan adalah 5,7% (Balitbangkes Depkes RI, 2008). Profil Kesehatan Indonesia tahun 2005 menunjukkan DM menempati urutan 9 dari 10 penyakit utama penyebab kematian menurut daftar tabulasi dasar (DTD) di rumah sakit dan menempati urutan 8 dari 10 penyakit terbanyak dengan jumlah 338.056 kasus pada *setting* rawat jalan di rumah sakit (Ahmad *et al.*, 2007).

Penyakit ini dipengaruhi oleh faktor genetik dan faktor non genetik, yaitu kondisi medis penyerta, faktor lingkungan, pola aktivitas, dan pola makan (WHO, 2011; Cockram, 2000). Berdasarkan penyebabnya, *American Diabetes Association* (2012) mengelompokkan DM menjadi beberapa tipe, yaitu:

1. Tipe 1, ditandai dengan destruksi sel β , biasanya mengarah pada defisiensi insulin absolut. Dapat dimediasi imun atau bersifat idiopatik.
2. Tipe 2, bervariasi dari resistansi insulin yang predominan dengan defisiensi insulin relatif hingga defek sekresi insulin yang dominan dengan resistansi insulin.
3. Tipe spesifik lainnya, terbagi menjadi:
 - a. Defek genetik sel β pankreas, ditandai dengan mutasi *hepatocyte nuclear transcription factor* (HNF) 4 α (*maturity onset of diabetes of the young* tipe 1 atau MODY 1), glukokinase (MODY 2), HNF-1 α (MODY 3),

insulin promoter factor-1 (IPF-1; MODY 4), HNF-1 β (MODY 5), neuroD1 (MODY 6), dan DNA mitokondria.

- b. Defek genetik kerja insulin, mencakup resistansi insulin tipe A, *leprechaunism*, sindrom Rabson-Mendenhall, dan sindrom lipodistrofi.
- c. Penyakit eksokrin pankreas, seperti pankreatitis pankreatektomi, neoplasia, fibrosis kistik, hemokromatosis, pankreatopati fibrokalkulus, dan mutasi karboksil ester lipase.
- d. Endokrinopati, misalnya pada akromegali, sindrom Cushing, glukagonoma, feokromositoma, hipertiroidisme, somatostatinoma, dan aldosteronoma.
- e. Diinduksi obat atau bahan kimia, misalnya *vacor*, *pentamidine*, asam nikotinat, glukokortikoid, hormon tiroid, *diazoxide*, agonis β -adrenergik, tiazid, fenitoin, interferon- α , inhibitor protease, dan *clozapine*.
- f. Infeksi, misalnya rubela kongenital, sitomegalovirus, dan *coxsackie*.
- g. Bentuk jarang DM yang dimediasi imun, yaitu *stiff person syndrome* dan antibodi anti-reseptor insulin.
- h. Sindrom genetik lain yang terkadang dihubungkan dengan DM, yaitu sindrom Down, sindrom Klinefelter, sindrom Turner, sindrom Wolfram, ataksia Friedreich, *Huntington's chorea*, sindrom Laurence-Moon-Biedl, distrofi miotonik, porfiria, dan sindrom Prader-Willi.

- 4. Tipe gestasional (diabetes melitus gestasional, DMG), ditandai dengan intoleransi glukosa dengan *onset* atau dideteksi pertama kali selama kehamilan.

Walaupun terdapat banyak tipe dengan penyebab yang beragam, namun kriteria untuk menegakkan diagnosis DM untuk tipe 1-3 tetap sama, yaitu:

- 1. A1C $\geq 6,5\%$, atau
- 2. glukosa darah puasa $\geq 7,0$ mmol/L (126 mg/dL), atau
- 3. glukosa darah 2 jam setelah makan (*post-prandial*) $\geq 11,1$ mmol/L (200 mg/dL) pada uji toleransi glukosa oral, atau
- 4. gejala klasik hiperglikemia (poliuria, polidipsia, penurunan berat badan, terkadang disertai polifagia, dan penurunan visus) atau krisis hiperglikemia dan kadar glukosa darah sewaktu $\geq 11,1$ mmol/L (200 mg/dL) (ADA, 2012).

Sedikit berbeda dengan DM tipe 1-3, kriteria diagnosis DMG kasus baru adalah bila ibu hamil tanpa riwayat DM menunjukkan tanda hiperglikemia pada pemeriksaan glukosa darah kehamilan minggu ke-24 sampai 28 maka ibu hamil tersebut didiagnosis sebagai DMG. Kriteria hiperglikemia pada ibu hamil adalah:

- 1. glukosa darah puasa ≥ 92 mg/dL (5,1 mmol/L), atau

2. glukosa darah 1 jam setelah makan ≥ 180 mg/dL (10 mmol/L), atau glukosa darah 2 jam setelah makan ≥ 153 mg/dL (8,5 mmol/L) (Metzger *et al.*, 2010).

3.1.1. Diabetes Melitus Tipe 2

Diabetes melitus tipe 2 merupakan tipe DM dengan persentase terbesar, yaitu 90-95%. Tipe ini sebelumnya juga dikenal sebagai *non-insulin-dependent diabetes* (NIDDM) atau DM *onset* dewasa. Risiko akan meningkat sejalan dengan umur, obesitas, dan kurangnya aktivitas fisik. Penyakit ini lebih sering ditemukan pada wanita dengan riwayat DMG dan pada individu dengan dislipidemia atau hipertensi (ADA, 2012).

Diabetes melitus tipe 2 ditandai dengan resistansi insulin dan defisiensi insulin relatif. Salah satu penyebab resistansi insulin adalah obesitas, khususnya obesitas sentral (ADA, 2012). Berdasarkan hipotesis beban lipid, saat adiposit dipenuhi triasilgliserol (TAG) dan adiposit tidak dapat lagi mengakomodasi penyimpanan TAG, adiposit dan prekursornya menjadi kurang sensitif terhadap insulin, akibatnya ekspresi gen yang berhubungan dengan perkembangan adiposit baru mengalami *downregulation* di adiposit, sedangkan di jaringan lain seperti otot rangka dan hepar mengalami *upregulation*. Jaringan otot rangka dan hepar kemudian juga menyimpan TAG. Penyimpanan TAG ektopik ini dapat bersifat toksik bila berlebihan, yang menyebabkan terjadi kerusakan sel pada individu yang rentan dan mengarah pada perkembangan DM tipe 2 (Nelson *and* Cox, 2008).

Insulin memegang peranan penting dalam metabolisme, terutama melalui perannya dalam meregulasi sekitar 150 gen yang berperan dalam pengaturan metabolisme. Insulin disekresi sebagai respons peningkatan glukosa darah, namun perannya tidak hanya terbatas pada metabolisme karbohidrat, seperti yang terlihat pada Tabel 1. Insulin juga berperan dalam keterkaitan (*interrelationship*) metabolisme karbohidrat, lipid, dan protein (Nelson *and* Cox, 2008).

Insulin bekerja dengan berikatan pada reseptor insulin yang terdapat di membran sel. Reseptor insulin yang berupa dimer akan saling memfosforilasi (transautofosforilasi) pada residu tirosin sehingga menyebabkan aktivasi reseptor. Reseptor yang teraktivasi akan memfosforilasi *insulin receptor substrate-1* (IRS-1) dan memulai proses transduksi sinyal intrasel (Nelson *and* Cox, 2008), seperti pada Gambar 1.

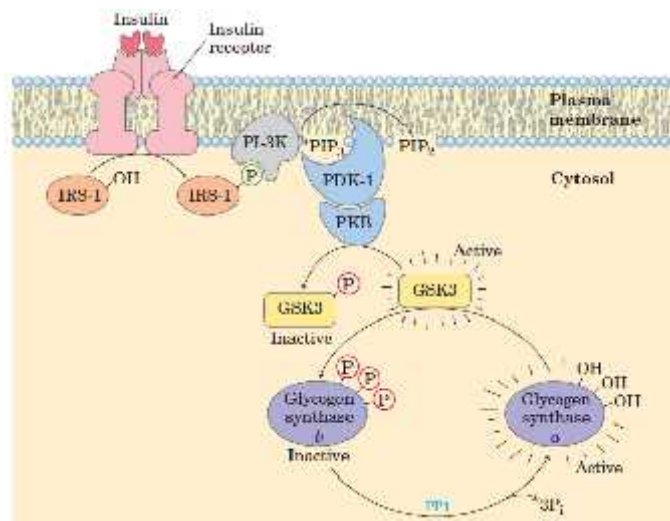
Efek transduksi sinyal insulin adalah stimulasi ambilan glukosa oleh otot dan adiposa untuk diubah menjadi glukosa 6-fosfat. Di hepar, insulin juga mengaktifkan glikogen sintase dan menginaktivasi glikogen fosforilase, sehingga glukosa 6-fosfat diubah menjadi glikogen (Nelson *and* Cox, 2008).

Tabel 1. Beberapa gen yang diregulasi oleh insulin.

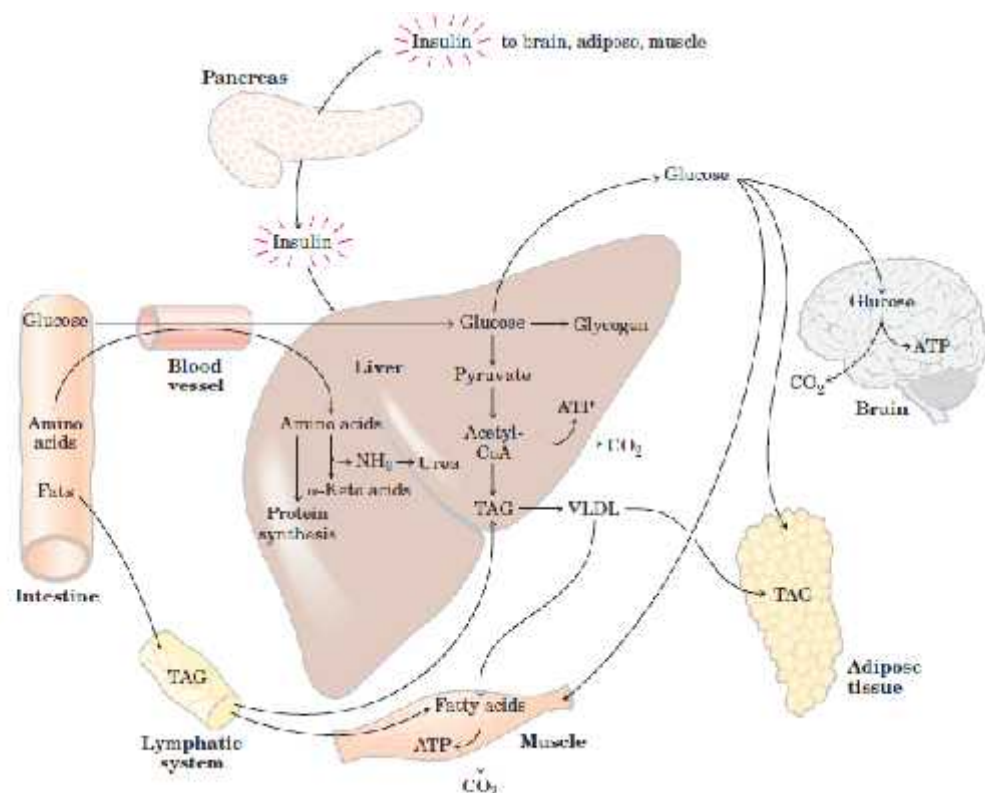
Perubahan ekspresi gen	Jalur
Peningkatan ekspresi	
Hexokinase II	Glikolisis
Hexokinase IV	Glikolisis
Fosfofruktokinase-1	Glikolisis
Piruvat kinase	Glikolisis
Fosfofruktokinase-2	Regulasi glikolisis/glukoneogenesis
Glukosa 6-fosfat dehidrogenase	Jalur pentosa fosfat
6-fosfoglukonat dehidrogenase	Jalur pentosa fosfat
Piruvat dehidrogenase	Sintesis asam lemak
Asetil-KoA karboksilase	Sintesis asam lemak
Enzim malat	Sintesis asam lemak
ATP-sitrat liase	Sintesis asam lemak
<i>Fatty acid synthase complex</i>	Sintesis asam lemak
Stearoil-KoA dehidrogenase	Desaturasi asam lemak
Asil-KoA-gliserol transferase	Sintesis triasilgliserol
Penurunan ekspresi	
Fosfoenolpiruvat karboksikinase	Glukoneogenesis
Subunit katalitik glukosa 6-fosfatase	Pelepasan glukosa ke darah

(Nelson and Cox, 2008).

Insulin juga menstimulasi penyimpanan kelebihan energi sebagai lemak di adiposa. Di hepar, insulin mengaktifkan oksidasi glukosa 6-fosfat menjadi piruvat melalui jalur glikolisis dan oksidasi piruvat menjadi asetil-KoA. Jika asetil-KoA tidak mengalami oksidasi lebih lanjut, maka akan digunakan untuk sintesis asam lemak. Asam lemak yang terbentuk ditranspor ke jaringan adiposa sebagai TAG di *very low density lipoprotein* (VLDL). Insulin menstimulasi sintesis TAG di adiposit dengan memanfaatkan asam lemak yang dihasilkan dari hidrolisis VLDL (Nelson and Cox, 2008). Garis besar efek insulin pada pengaturan metabolisme dapat dilihat pada Gambar 2 dan enzim target yang terlibat dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 1. Jalur transduksi sinyal insulin dalam meregulasi glikogen sintase (Nelson and Cox, 2008).



Gambar 2. Regulasi metabolisme oleh insulin (Nelson and Cox, 2008).

Pada resistansi insulin, jalur sinyal intrasel tidak dapat berjalan normal. Resistansi insulin dapat disebabkan oleh berbagai sitokin seperti resistin, interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), *tumor necrosis factor α* (TNF α), *suppressors of cytokine signaling-1* (SOCS-1), *suppressors of cytokine signaling-3* (SOCS-3), dan *suppressors of cytokine signaling-6* (SOCS-6) (Devlin, 2006; Mooney *et al.*, 2001; Rui, 2002). Struktur SOCS-1 dan SOCS-3 menunjukkan adanya sisi pengikatan IRS-1, elongin B, elongin C, dan ubiquitin ligase yang berperan dalam memediasi ubiquitinasi dan degradasi IRS-1. Degradasi IRS-1 menyebabkan kaskade transduksi sinyal tidak dapat berjalan sehingga berujung pada resistansi insulin (Rui, 2002).

Pada keadaan resistansi insulin, jaringan menjadi kurang responsif terhadap insulin sehingga dibutuhkan jumlah insulin yang lebih besar untuk meregulasi kadar glukosa darah sehingga pada awalnya ditemukan peningkatan sekresi insulin. Hiperглиkemia dan hiperinsulinemia menyebabkan peningkatan sintesis TAG di hepar, sehingga meningkatkan kadar kolesterol VLDL dalam darah yang berujung pada peningkatan sintesis TAG di adiposa. Karena kemampuan jaringan yang sensitive insulin untuk mengambil glukosa mengalami penurunan, maka dapat ditemukan adanya glukoneogenesis walaupun proses lipogenesis tetap berjalan. Proses glukoneogenesis

dan lipogenesis pada saat yang bersamaan tidak dapat ditemukan pada keadaan normal (Devlin, 2006).

Tabel 2. Efek insulin terhadap glukosa darah.

Efek metabolik	Enzim target
Peningkatan ambilan glukosa (otot, adiposa)	<i>Glucose transporter</i> (GLUT4)
Peningkatan ambilan glukosa (hepar)	Glukokinase
Peningkatan sintesis glikogen (hepar, otot)	Glikogen sintase
Penurunan pemecahan glikogen (hepar, otot)	Glikogen fosforilase
Peningkatan glikolisis dan produksi asetil-KoA (hepar, otot)	Fosfofruktokinase-1 dan -2, kompleks piruvat dehidrogenase
Peningkatan sintesis asam lemak (hepar)	Asetil-KoA karboksilase
Peningkatan sintesis triasilgliserol (adiposa)	Lipoprotein lipase

(Nelson and Cox, 2008).

3.1.2. Komplikasi Diabetes Melitus

Pada DM, gangguan metabolisme karbohidrat, lipid, dan protein memegang peranan penting dalam kemunculan komplikasi (Abou-Seif and Youssef, 2004). Komplikasi ini dapat berupa komplikasi akut dan kronik. Komplikasi akut meliputi ketoasidosis diabetikum dan status hiperosmolar hiperglikemia, sedangkan komplikasi kronik mencakup gangguan mikrovaskular, makrovaskular, dan gangguan organ lain yang bersifat nonvaskular (Fauci *et al.*, 2008).

Ketoasidosis diabetikum umumnya ditemukan pada DM tipe 1, namun sebagian kasus juga ditemukan pada DM tipe 2. Diabetes melitus yang tidak terkontrol menyebabkan produksi benda keton yang berlebihan (ketosis). Benda keton bersifat asam sehingga dapat menyebabkan gangguan keseimbangan asam basa dalam darah karena jumlah benda keton yang terdapat dalam darah melebihi kapasitas sistem dapar bikarbonat. Akibatnya terjadi penurunan pH darah (asidosis). Ketosis dan asidosis disebut sebagai ketoasidosis, ditandai dengan konsentrasi benda keton darah > 90 mg/100 mL dan konsentrasi benda keton urin > 5.000 mg/24 jam (Wolfsdorf *et al.*, 2007).

Terjadinya komplikasi akut dipengaruhi oleh kontrol hiperglikemia, namun komplikasi kronik juga dipengaruhi oleh durasi penyakit (Fauci *et al.*, 2008). Hiperglikemia dapat menyebabkan produksi anion superoksida yang berlebihan melalui jalur protein kinase C (PKC), jalur heksosamin dan poliol, pembentukan *advanced glycation end product* (AGE). Seluruhnya terlibat dalam patogenesis komplikasi diabetes dengan penghambatan aktivitas gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenase (GADPH) (Kiss and Szabó, 2005; Heltianu and Guja, 2011). Anion superoksida berinteraksi dengan nitrogen monoksida (NO) menghasilkan peroksinitrit sehingga menyebabkan peningkatan stres oksidatif dan nitrosatif. Peningkatan stres oksidatif dan nitrosatif mengaktifkan poli(ADP-ribosa) polimerase-1 (PARP) yang merupakan enzim nucleus. Enzim ini dapat

mendepleksi NAD^+ dan menghambat GADPH dengan ribosilasi-poli-ADP yang dapat menyerang berbagai biomolekul di endotel pembuluh darah, otot polos pembuluh darah dan miokardium, menyebabkan disfungsi kardiovaskular, termasuk disfungsi mikrovaskular (Kiss *and* Szabó, 2005; Pacher *et al.*, 2005). Peroksinitrit juga dapat menyebabkan produksi nitrotirosin, suatu bentuk modifikasi asam amino. Nitrotirosin dihubungkan dengan derajat kematian dan/atau disfungsi sel pada sel endotel, miosit dan fibroblast jantung (Pacher *et al.*, 2005).

3.1.3. Penatalaksanaan Diabetes Melitus

Tujuan umum penatalaksanaan DM adalah meningkatkan kualitas hidup penyandang DM, yang dapat dibagi lagi menjadi tujuan jangka pendek dan jangka panjang:

1. Menghilangkan keluhan dan tanda DM, mempertahankan rasa nyaman, dan mencapai target pengendalian glukosa darah pada jangka pendek.
2. Mencegah dan menghambat progresivitas penyulit mikroangiopati, makroangiopati, dan neuropati pada jangka panjang (Perkeni, 2011).

Tujuan akhir pengelolaan DM adalah penurunan morbiditas dan mortalitas DM (Perkeni, 2011). Strategi yang digunakan untuk mencapai tujuan ini adalah perbaikan gaya hidup. Strategi lain adalah penggunaan obat-obatan untuk mengontrol kadar glukosa darah (Watkins, 2003). Di Indonesia, strategi ini dikenal sebagai empat pilar penatalaksanaan DM (Perkeni, 2011).

Empat pilar penatalaksanaan DM adalah edukasi, terapi nutrisi medis, latihan jasmani, dan farmakologis. Pengelolaan DM dimulai dengan pengaturan makan dan latihan jasmani selama 2-4 minggu, dan bila target kadar glukosa darah belum tercapai maka ditambahkan intervensi farmakologis dengan obat hipoglikemik oral (OHO) dan atau suntikan insulin (Perkeni, 2011).

Pengaturan makan yang sesuai dengan terapi nutrisi medis merupakan hal penting dalam penatalaksanaan DM. Prinsipnya adalah gizi seimbang dan sesuai kebutuhan, seperti juga pada populasi normal, namun perlu ditekankan pentingnya keteraturan jadwal makan, jenis, dan jumlah makanan, terutama pada pasien yang mendapat intervensi farmakologis (Perkeni, 2011).

Selain pengaturan makan, latihan jasmani juga merupakan hal penting dalam pengelolaan DM. Latihan jasmani yang dianjurkan adalah yang bersifat aerobik dengan frekuensi 3-4 kali seminggu berdurasi 30 menit, intensitas latihan dapat disesuaikan dengan tingkat kebugaran pasien, ditambah dengan kegiatan jasmani sehari-hari (Perkeni, 2011).

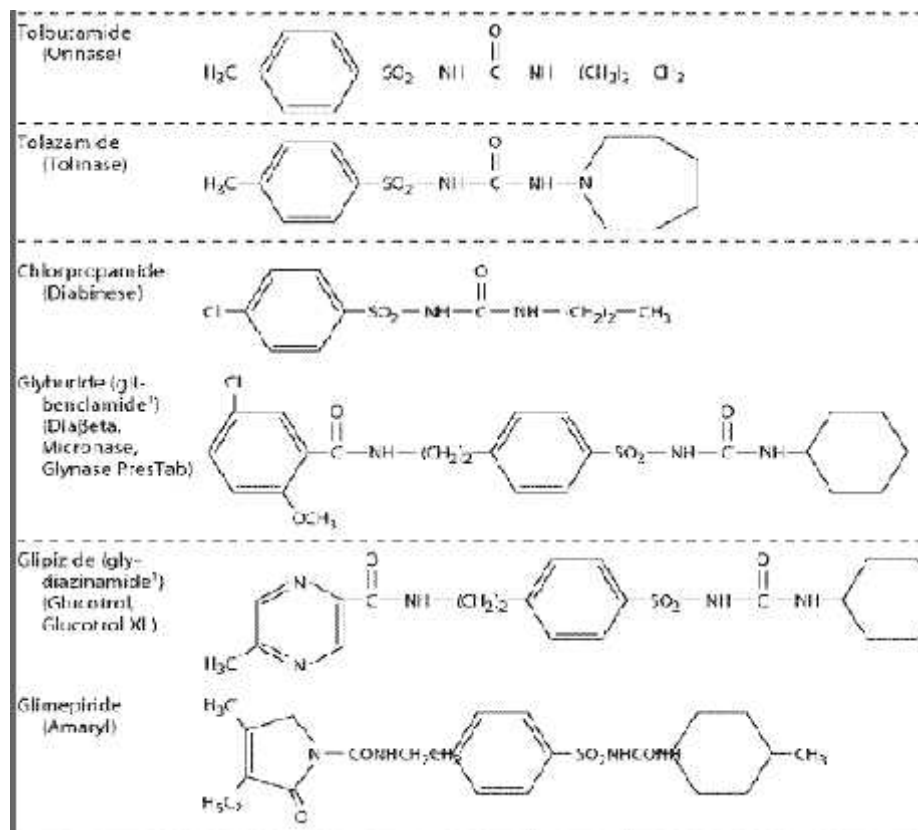
Intervensi farmakologis dalam penatalaksanaan DM mencakup:

1. Obat hipoglikemik oral, terdiri dari:
 - a. Golongan obat pemicu sekresi insulin, yaitu sulfonilurea dan glinid.
 - b. Golongan obat yang meningkatkan sensitivitas terhadap insulin, yaitu metformin dan tiazolidindion.
 - c. Golongan obat penghambat glukoneogenesis, yaitu metformin.
 - d. Golongan obat penghambat absorpsi glukosa, yaitu *acarbose*.
 - e. Golongan inhibitor *dipeptidyl peptidase-4* (DPP-4).
2. Suntikan:
 - a. Insulin.
 - b. Agonis *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) atau *incretin mimetic* (Perkeni, 2011).

Sulfonilurea menginduksi sekresi insulin melalui ikatan dengan subunit *sulfonylurea receptor* (SUR). *Sulfonylurea receptor* merupakan salah satu penyusun kanal K_{ATP} (kanal ion yang mengkonduksi K^+ dan sensitif terhadap ATP). Terikatnya sulfonilurea pada subunit SUR kanal K_{ATP} menyebabkan penghambatan aktivitas kanal K_{ATP} sehingga terjadi depolarisasi membran sel β pankreas yang menyebabkan terbukanya kanal ion kalsium. Akibatnya terjadi peningkatan konsentrasi kalsium intrasel yang menjadi pemicu eksositosis insulin. Sulfonilurea dibagi menjadi generasi pertama (*tolbutamide*, *chlorpropamide*, dan *tolazamide*) dan generasi kedua (*glyburide* atau glibenklamid, *glipizide*, dan *glimepiride*). Struktur kimia obat golongan sulfonilurea dapat dilihat pada Gambar 3. (Katzung, 2004).

Sulfonilurea generasi kedua lebih sering diresepkan karena efek samping dan interaksi obat yang tidak sebanyak generasi pertama. Di antara obat-obat generasi kedua, glibenklamid merupakan obat yang paling sering diresepkan. Glibenklamid dimetabolisme di hepar dan menghasilkan produk yang memiliki aktivitas hipoglikemik rendah. Kontraindikasi glibenklamid adalah pasien dengan gangguan hepar dan insufisiensi ginjal (Katzung, 2004).

Selain berperan dalam kontrol glikemik, glibenklamid juga mempengaruhi profil lipid pada DM. Glibenklamid 5 mg/kg selama 6 minggu pada tikus DM dapat menurunkan kadar trigliserida, kolesterol total, dan LDL, serta meningkatkan kadar HDL secara signifikan (Fondjo *et al.*, 2012). Penelitian Mughal *et al.* (1999) menunjukkan pemberian glibenklamid selama 12 minggu pada pasien DM tipe 2 dapat meningkatkan kadar HDL secara signifikan walaupun belum mencapai kadar normal, sedangkan kadar kolesterol total, trigliserida, LDL, dan VLDL tidak menurun secara signifikan. Perbaikan HDL yang masih di bawah nilai normal ini mungkin disebabkan oleh peningkatan katabolisme apolipoprotein A-I (apo A-I) pada dislipidemia diabetikum.



Gambar 3. Struktur kimia obat golongan sulfonilurea. Obat yang diberi tanda ¹ merupakan nama lain obat di luar Amerika Serikat (Katzung, 2004).

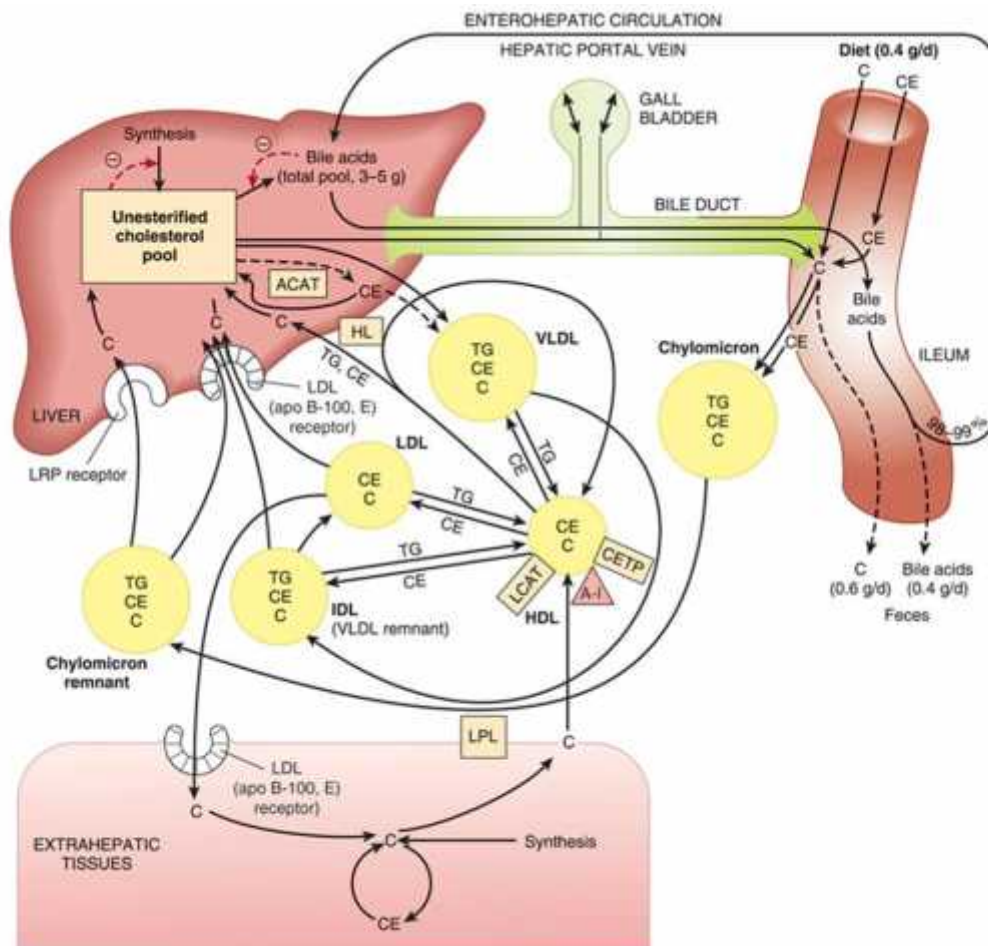
3.2. Transpor dan Metabolisme VLDL

Very low density lipoprotein merupakan salah satu lipoprotein utama dalam plasma. Lipoprotein ini memiliki berat jenis < 1,006 g/mL dan diameter 40-50 nm. Kandungan proteinnya sekitar 10%. Kadar VLDL dalam plasma adalah 0,1-0,4 mmol/L (3,867-15,468 mg/dL) dan pada keadaan puasa berkisar antara 0,2-1,2 mmol/L (7,734-46,404 mg/dL) (Bonow *et al.*, 2012).

Kolesterol VLDL merupakan bentuk transportasi TAG selain kilomikron. Kilomikron ditemukan pada *chyle* yang berasal dari sistem limfatik usus dan berperan dalam transpor lipid dari makanan ke sirkulasi. Sejumlah kecil kolesterol VLDL juga ditemukan di *chyle*, namun mayoritas kolesterol VLDL berasal dari hepar. Kolesterol VLDL membawa TAG dari hepar ke jaringan ekstrahepatik (Murray *et al.*, 2009). Transpor TAG antar jaringan dapat dilihat pada Gambar 4.

Kilomikron dan VLDL yang baru terbentuk (*nascent*) hanya mengandung sedikit apolipoprotein C (apo C) dan E (apo E). Kedua apolipoprotein ini diperoleh dari *high density lipoprotein* (HDL) di sirkulasi. Apolipoprotein B (apo B) merupakan komponen penting pembentukan kilomikron dan kolesterol VLDL (Murray *et al.*, 2009).

Triasilgliserol dalam kilomikron dan kolesterol VLDL dihidrolisis oleh lipoprotein lipase (LPL) yang terletak di dinding pembuluh kapiler terikat pada rantai proteoglikan heparin sulfat. Fosfolipid dan apo C-II merupakan kofaktor untuk aktivitas LPL, sedangkan apo A-II dan apo C-III merupakan inhibitor. Reseptor VLDL memegang peranan penting dalam hidrolisis TAG di VLDL. Reseptor akan mengikat VLDL dan mengarahkannya ke LPL. Hidrolisis terjadi ketika lipoprotein terikat pada enzim di endotel, TAG dihidrolisis menjadi diasilgliserol (DAG), lalu menjadi monoasilgliserol (MAG), dan akhirnya menjadi asam lemak bebas dan gliserol. Sebagian asam lemak bebas yang dilepaskan kembali ke sirkulasi, terikat pada albumin, namun sebagian besar ditranspor ke jaringan (Murray *et al.*, 2009).



Gambar 4. Transpor kolesterol antar jaringan pada manusia. C adalah *unesterified cholesterol*, CE adalah kolesterol ester, TG adalah triasilgliserol, VLDL adalah *very low density lipoprotein*, IDL adalah *intermediate-density lipoprotein*, LDL adalah *low density lipoprotein*, HDL adalah *high-density lipoprotein*, ACAT adalah *acyl-CoA cholesterol acyltransferase*, LCAT adalah *lecithin cholesterol acyltransferase*, A-I adalah apolipoprotein A-I, CTEP adalah *cholesteryl ester transfer protein*, LPL adalah lipoprotein lipase, HL adalah *hepatic lipase*, LRP adalah *LDL receptor-related protein* (Murray *et al.*, 2009).

Reaksi yang dikatalisis LPL menyebabkan hilangnya 70-90% TAG pada kilomikron dan kembalinya apo C ke HDL. Diameter *chylomicron remnant* yang terbentuk hanya setengah dari kilomikron awal dan mengandung kolesterol dan kolesterol ester yang tinggi karena kehilangan TAG. Hal yang sama juga terjadi pada VLDL dan menghasilkan *VLDL remnant* atau *intermediate-density lipoprotein* (IDL). *Chylomicron remnant* diendositosis oleh hepar yang diperantarai reseptor, kemudian kolesterol ester dan TAG dihidrolisis dan dimetabolisme, sedangkan IDL akan diendositosis oleh hepar melalui reseptor LDL atau dikonversi menjadi LDL. Pada manusia, sebagian besar IDL dikonversi menjadi LDL dan menjadi penyebab peningkatan konsentrasi LDL (Murray *et al.*, 2009).

Gliserol yang dihasilkan oleh reaksi yang dikatalisis LPL dilepas ke sirkulasi sistemik. Perubahan gliserol menjadi gliserol-3-fosfat tergantung pada enzim gliserol kinase sehingga hanya dapat dilakukan oleh jaringan yang memiliki enzim gliserol kinase, mayoritas ditemukan di hepar dan ginjal. Walaupun jaringan otot rangka tidak memiliki enzim gliserol kinase dalam jumlah besar, namun otot tetap dapat memanfaatkan gliserol. Selain difosforilasi dan diinkorporasi dalam simpanan TAG otot, gliserol juga digunakan sebagai sumber energi melalui proses oksidasi gliserol yang diinisiasi oleh gliserol dehidrogenase (Murray *et al.*, 2009; Coppack *et al.*, 1999; van Hall *et al.*, 2002).

Selain dapat memanfaatkan gliserol sebagai sumber energi, jaringan otot rangka juga berperan penting dalam oksidasi asam lemak, 50-80% asam lemak ini berasal dari TAG di sirkulasi. Sebagian besarnya ini disimpan di otot sebagai TAG untuk dioksidasi saat dibutuhkan. Aktivitas LPL dan ambilan asam lemak dari TAG pada serabut otot merah lima kali lipat lebih tinggi dari serabut otot putih (Cortright *et al.*, 1997; Mackie *et al.*, 1980; Terjung *et al.*, 1982; Linder, 1976).

3.3. Lipoprotein Lipase

Lipoprotein lipase (LPL) berperan penting dalam metabolisme dan transpor lipid (Wang and Eckel, 2009). Enzim ini menghidrolisis TAG dari kilomikron dan VLDL, serta meregulasi pembentukan asam lemak untuk penyimpanan atau pemanfaatan energi (Kovář *et al.*, 2004; Unal *et al.*, 2008). Reaksi hidrolisis TAG dari kilomikron menghasilkan *chylomicron remnant*, sedangkan reaksi hidrolisis TAG dari VLDL menghasilkan *VLDL remnant* atau IDL. Lipoprotein lipase juga dapat berinteraksi dengan lipoprotein sehingga lipoprotein terikat di membran pembuluh darah dan meningkatkan ambilan lipoprotein (Wang and Eckel, 2009).

Lipoprotein lipase termasuk golongan TAG lipase. Golongan ini memiliki aktivitas TAG esterase dan aktivitas fosfolipase yang beragam (Wang and Eckel, 2009). Pada manusia, gen LPL terletak di kromosom 8p22 (Sparkes *et al.*, 1987). Gen ini tersusun

dari 10 ekson sepanjang ≈ 30 kb. Ekson 1 mengkode regio 5'-UTR, peptida sinyal, dan dua asam amino pertama dari protein matur. Ekson 2-9 mengkode 446 asam amino sisanya, dan ekson 10 mengkode 3'UTR sepanjang 1.948 nukleotida (Wion *et al.*, 1987; Kirchgessner *et al.*, 1989).

Berbagai jaringan ekstrahepatik, diantaranya jaringan adiposa, jantung, otot rangka, paru, *glandula mammae* aktif, otak, ginjal, dan makrofag dapat mengekspresikan enzim LPL untuk ditranspor ke endotel kapiler jaringan-jaringan tersebut (Kirchgessner *et al.*, 1989; Kovář *et al.*, 2004; Unal *et al.*, 2008). Di permukaan lumen pembuluh darah, LPL akan berikatan dengan *heparin sulfate proteoglycan* (HSPG) dan/atau fosfatidilinositol (Eisenberg *et al.*, 1992).

Manusia dan mencit memiliki dua jenis utama mRNA, yaitu berukuran 3,6 dan 3,4 kb, namun pada tikus hanya ditemukan jenis 3,6 kb. Perbedaan ukuran ini disebabkan oleh perbedaan poliadenilasi di ujung 3'-UTR (Wang *and* Eckel, 2009).

Protein LPL terdiri memiliki domain ujung amino dan ujung karboksil yang lebih pendek. Di antara kedua domain terdapat peptida fleksibel yang berfungsi sebagai penghubung (Wong *et al.*, 1994). Ujung amino mengandung trias katalitik (Ser¹³², Asp¹⁵⁶, His²⁴¹) sedangkan ujung karboksil mengandung domain pengikatan heparin. Kofaktor apolipoprotein C-II (apo C-II) dibutuhkan dalam aktivitas LPL (Catapano, 1982). Dalam bentuk aktif, enzim ini ditemukan dalam bentuk homodimer yang dihubungkan oleh ikatan nonkovalen (Wong *et al.*, 1997).

Sintesis LPL terutama terjadi di jaringan adiposa dan otot. Sintesis LPL diregulasi dengan pola yang spesifik jaringan sebagai respons terhadap stimulus nutrisi dan hormonal (Kovář *et al.*, 2004; Unal *et al.*, 2008). Mekanisme regulasi LPL dapat terjadi pada tahap transkripsi, pascatranskripsi, translasi, dan pascatranslasi (Unal *et al.*, 2008).

Mekanisme regulasi LPL pada tahap transkripsi melibatkan beragam *regulatory element* di regio 5', yaitu *CT element*, *sterol regulatory element 2*, *interferon- λ -responsive element*, *peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-responsive element*, *oxysterol liver X receptor-responsive element*, *anterior protein-1 (AP-1) element*, dan *AP-1-like element*. Setelah ditranslasi, polipeptida mengalami dimerisasi dan glikosilasi di retikulum endoplasma kemudian ditranspor ke badan Golgi. Selanjutnya LPL ditranspor menggunakan vesikel sekretorik menuju lisosom untuk degradasi intrasel atau ke permukaan sel parenkim tempat enzim berikatan dengan HSPG dan bertranslokasi ke permukaan endotel (Wang *and* Eckel, 2009).

Sintesis LPL merupakan respons terhadap stimulus nutrisi dan hormonal (Kovář *et al.*, 2004; Unal *et al.*, 2008). Glukosa dapat meningkatkan aktivitas LPL di jaringan adiposa terutama melalui glikosilasi LPL (Wang *and* Eckel, 2009), namun efek sebaliknya

ditemukan pada jaringan otot (Kiens *et al.*, 1989). Stimulus hormonal yang meregulasi LPL adalah insulin dan katekolamin. Insulin meningkatkan transkripsi gen LPL di jaringan serta meregulasi aktivitas LPL pada tingkat pascatranskripsi dan pascatranslasi. Aktivitas LPL meningkat pada kondisi hiperinsulinemia saat kenyang dan dihambat pada keadaan lapar, saat insulin rendah dan stimulasi lipolisis yang dimediasi katekolamin predominan. Katekolamin dan insulin merupakan regulator resiprokal fisiologis LPL (Unal *et al.*, 2008). Lipoprotein lipase jaringan adiposa sensitif terhadap perubahan yang terjadi pada DM. Penelitian pada subyek dengan derajat sensitivitas insulin yang berbeda menunjukkan penurunan aktivitas LPL di jaringan adiposa dan plasma pasca heparin pada subyek resistan insulin dan DM. Perbaikan kontrol DM meningkatkan aktivitas LPL adiposa (Unal *et al.*, 2008).

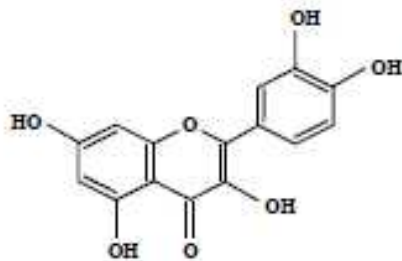
Protein kinase $\text{C}\alpha$ ($\text{PKC}\alpha$) dapat meregulasi LPL pada tingkat translasi melibatkan regio 3'-UTR mRNA LPL, namun tidak demikian dengan isoform lain. Protein kinase $\text{C}\alpha$ mengaktivasi jalur sinyal Raf1-MEK [*mitogen-activated protein kinase/ERK (extracellular signal-regulated kinase)*]-ERK dengan memfosforilasi Raf1. Inhibisi $\text{PKC}\alpha$ di jaringan adiposa dapat menghambat translasi LPL sehingga menurunkan sintesis LPL (Wang and Eckel, 2009; Unal *et al.*, 2008; Ranganathan *et al.*, 2002).

Protein kinase lain yang dapat meregulasi LPL adalah protein kinase A (PKA), yaitu pada tingkat pascatranslasi. Aktivitas LPL rendah pada saat lapar karena hormon seperti adrenalin menghambat aktivitas LPL. Adrenalin menstimulasi aktivasi PKA yang dimediasi cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*). Mekanisme inhibisi LPL oleh adrenalin di jaringan adiposa melibatkan interaksi antara kompleks pengikatan RNA (*RNA binding complex*), yang memiliki komponen subunit katalitik dan regulatorik holoenzim PKA dan *PKA anchor protein AKAP121*, dengan 3'-UTR mRNA (Unal *et al.*, 2008).

Protein kinase A dan $\text{PKC}\alpha$ memiliki interaksi yang fungsional berlawanan. Di hepatosit, insulin menginduksi aktivasi $\text{PKC}\alpha$ yang menurunkan aktivitas cAMP dan PKA hasil distimulasi *secretin*. Efek berlawanan lainnya dapat dilihat pada jalur Raf1-MEK-ERK. Aktivasi $\text{PKC}\alpha$ secara langsung memfosforilasi Raf1 sehingga Raf1 menjadi aktif, sedangkan aktivasi PKA menghambat interaksi Raf1 dengan Ras sehingga menghambat aktivitas. Pada resistansi insulin, obesitas, dan diabetes, kadar asam lemak bebas dan diasilgliserol (DAG) darah meningkat secara kronik sehingga menyebabkan deplesi $\text{PKC}\alpha$ adiposit walaupun peningkatan DAG akut dapat menstimulasi $\text{PKC}\alpha$. Akibatnya terjadi penurunan aktivitas LPL. Deplesi $\text{PKC}\alpha$ juga meningkatkan kadar cAMP dan aktivasi PKA, yang kemudian memicu lipolisis dan menghambat LPL di adiposit. Proses ini memacu pelepasan asam lemak bebas dari adiposit pada keadaan hiperglikemia hipoinsulinemia (Unal *et al.*, 2008).

3.4. Kuersetin

Kuersetin memiliki nama resmi 3,3',4',5,7-pentahidroksilflavon (Murakami *et al.*, 2008). Senyawa flavonoid polifenol ini memiliki efek antiinflamasi, antiproliferasi, dan antioksidan (Kleemann *et al.*, 2011). Kuersetin memiliki struktur kimia dasar berupa difenilpropana (C6-C3-C6), sering terikat pada gula (glikosida). Pada kuersetin, struktur difenilpropana terikat pada *aglycones*, membentuk 3 cincin dan 5 gugus hidroksil (Aguirre *et al.*, 2011). Struktur kuersetin dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur kuersetin (Aguirre *et al.*, 2011).

Kuersetin ditemukan di dalam buah, sayur, teh, dan *wine* (Aguirre *et al.*, 2011), kandungan kuersetin terbesar ditemukan pada bawang mentah, yaitu 22,6 mg/100 g (Mangels *et al.*, 1993). Kandungan kuersetin pada bahan makanan tertentu dapat dilihat pada Tabel 3.

Kuersetin diserap di usus halus sebagai *quercetin aglycone* atau diabsorpsi melalui jalur *sodium-dependent glucose transporter-1* (SGLT-1). Kuersetin monoglukosida dihidrolisis oleh *lactose phorizin hydrolase* (LPH) di *brush border* sedangkan kuersetin bentuk lain diserap setelah mengalami dekonjugasi oleh bakteri usus. (Murakami *et al.*, 2008).

Saat diabsorpsi di usus halus, kuersetin segera dimetabolisme oleh enzim yang terdapat di sel epitel mukosa usus. Sebagian hasil metabolisme di epitel usus dimetabolisme lebih lanjut oleh hepar. Gugus katekol kuersetin dimetilasi pada posisi 3' atau 4' oleh *catechol-O-methyl transferase* (COMT), membentuk isorhamnetin (3'OCH₃-kuersetin) atau tamarixetin (4'OCH₃-kuersetin). Kuersetin dan metabolitnya dapat dikonjugasi dengan asam glukuronat atau sulfat pada gugus hidroksil, yang dikatalisis oleh enzim *uridine-5'-diphosphate-glucuronosyltransferase* atau sulfotransferase (van der Woude *et al.*, 2004). Waktu paruh plasma kuersetin pada manusia adalah 17-28 jam (Hollman and Arts, 2000; Manach and Donovan, 2004).

Tabel 3. Kandungan kuersetin pada bahan makanan tertentu.

Bahan Makanan	Kandungan Kuersetin (mg/100 g)
Brokoli, mentah	2,8
Wortel, mentah	0,4
Seledri, mentah	3,5
Bubuk kakao	20,1
<i>Cranberries</i> , mentah	14,0
<i>Kale</i> , mentah	5,1
Daun selada mentah	2,0
<i>Lingonberries</i> , mentah	11,3
Bawang mentah	22,6
Tomat masak	0,5

(Mangels *et al.*, 1993).

Penelitian Egert *et al.* (2008) terhadap bioavailabilitas kuersetin dengan dosis 50, 100, dan 500 mg selama 2 minggu dapat meningkatkan kadar kuersetin 178, 359, dan 570% setiap harinya. Penelitian Jin *et al.*, (2010) menunjukkan bahwa pemberian kuersetin selama 12 minggu dengan dosis harian 500 dan 1.000 mg menunjukkan peningkatan kadar kuersetin plasma menjadi 332 dan 516 mg/L. Data tersebut menunjukkan bahwa pemberian kuersetin dapat meningkatkan secara signifikan kadar kuersetin plasma dan menjaga bioavailabilitasnya.

Penelitian mengenai distribusi kuersetin di jaringan tikus oleh de Boer *et al.* (2005) menunjukkan konsentrasi kuersetin tertinggi ditemukan di plasma, sedangkan konsentrasi terendah ditemukan di otak, limpa, dan lemak putih. Konsentrasi kuersetin di setiap jaringan tikus yang diteliti dapat dilihat pada Tabel 4.

Kuersetin memiliki beragam fungsi biologis, misalnya aktivitas antikarsinogenik, antiinflamasi, antiviral, dan antioksidan (Aguirre *et al.*, 2011; Kleemann *et al.*, 2011). Aktivitas antioksidan kuersetin sangat dipengaruhi oleh strukturnya dan kapasitas antioksidannya lebih besar dibanding *kaempferol*, apigenin, galangin, dan *chrysin* (Chaillou and Nazareno, 2006).

Kuersetin juga berperan dalam pengaturan metabolisme. Percobaan pada tikus yang diinduksi obesitas dengan monosodium glutamat (MSG) menunjukkan kuersetin dapat menurunkan kadar glukosa darah, meningkatkan HDL, serta menurunkan kadar trigliserida, kolesterol total, VLDL, dan LDL melalui aktivitas antioksidan (Sevia *et al.*, 2012). Perbaikan metabolisme yang sama juga tampak pada mencit *db/db* (Jeong *et al.*, 2012).

Penelitian de Boer *et al.* (2006) menggunakan jaringan paru tikus Fisher jantan yang diberi kuersetin 0,1% (setara dengan 50 mg/kg berat badan) dan 1% (setara dengan 500 mg/kg berat badan) selama 41 minggu menunjukkan *upregulation* gen LPL, Acaa2, Ech1, Acox1, Pcca, Hmgcs2, dan Hibadh yang dibuktikan dengan metode *microarray*. Analisis ekspresi gen dengan qRT-PCR menunjukkan ekspresi gen Ech1

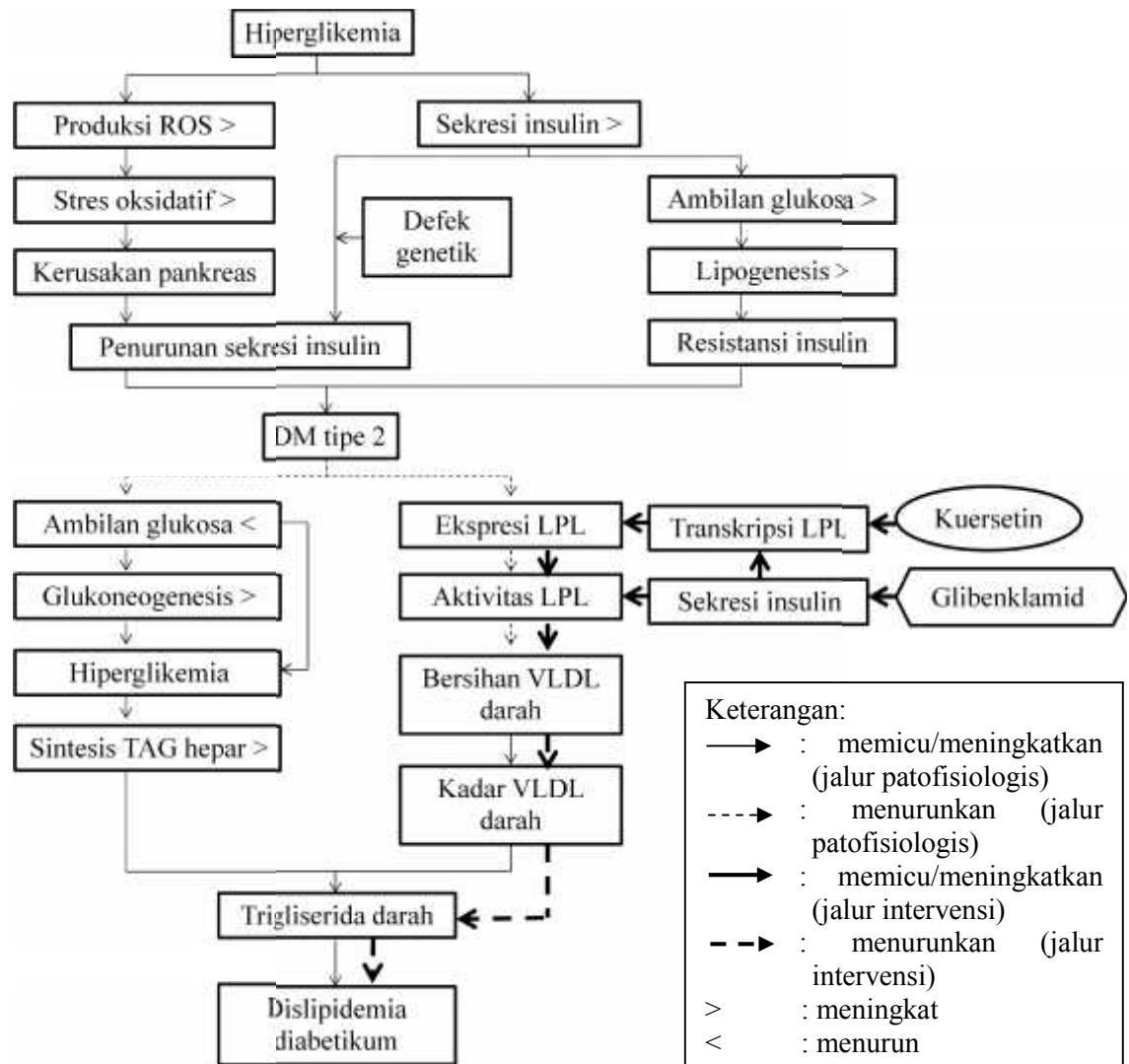
meningkat signifikan pada kedua dosis kuersetin, sedangkan ekspresi gen *Hmgcs2* hanya meningkat signifikan pada dosis 0,1%. Ekspresi gen *Acaa2*, *Acox1*, *Pcca*, dan *LPL* juga meningkat pada dosis 1%, namun karena jumlah sampel yang kecil maka analisis dengan qRT-PCR tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Tabel 4. Konsentrasi kuersetin di jaringan tikus setelah pemberian kuersetin selama 11 minggu.

Jaringan	Konsentrasi Kuersetin di jaringan (nmol/g jaringan) ^a	
	Asupan Kuersetin 0,1%	Asupan Kuersetin 1%
Plasma	7,70	40,4
Paru	1,04	5,02
Testis	0,82	4,37
Ginjal	0,93	3,67
Jantung	0,50	2,66
Hepar	0,52	2,46
Lemak coklat	0,15	2,25
Timus	0,15	1,53
Otot	0,12	1,83
Tulang	0,14	1,21
Otak	< 0,12	< 0,12
Limpa	< 0,12	0,06
Lemak putih	< 0,12	< 0,12

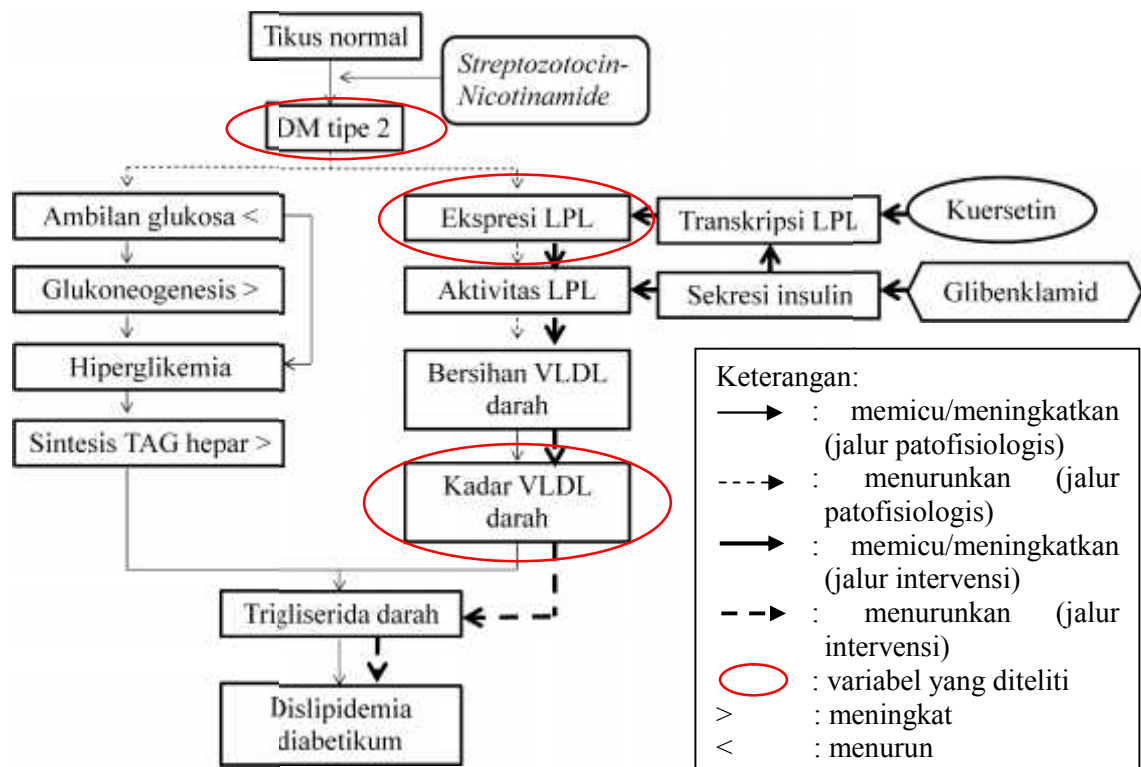
^a Konsentrasi plasma dinyatakan dalam satuan $\mu\text{mol/L}$ (de Boer *et al.*, 2005).

3.5. Kerangka Teori



Gambar 6. Kerangka teori.

3.6. Kerangka Konsep



Gambar 7. Kerangka konsep penelitian.

3.7. Hipotesis

1. Kadar *very low density lipoprotein* (VLDL) serum tikus Wistar model DM tipe 2 lebih rendah pada pemberian kombinasi kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB dibanding kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kg berat badan (BB), glibenklamid 5 mg/kgBB, dan plasebo.
2. Ekspresi LPL di jaringan otot rangka tikus Wistar model DM tipe 2 lebih rendah pada pemberian kombinasi kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB dibanding kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kg berat badan (BB), glibenklamid 5 mg/kgBB, dan plasebo.
3. Kadar VLDL serum berbanding terbalik dengan ekspresi LPL di jaringan otot rangka tikus Wistar model DM tipe 2 setelah pemberian kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB, kombinasi kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB, dan glibenklamid 5 mg/kgBB.

Bab 4. Tujuan Penelitian

4.1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek kuersetin terhadap kadar kolesterol *very low density lipoprotein* (VLDL) serum dan ekspresi LPL pada jaringan otot rangka tikus Wistar model DM tipe 2.

4.2. Tujuan Khusus

1. Mengetahui pengaruh pemberian kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB, kombinasi kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB, glibenklamid 5 mg/kgBB, dan plasebo terhadap kadar *very low density lipoprotein* (VLDL) serum tikus Wistar model DM tipe 2.
2. Mengetahui pengaruh pemberian kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB, kombinasi kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB, glibenklamid 5 mg/kgBB, dan plasebo terhadap ekspresi LPL di jaringan otot rangka tikus Wistar model DM tipe 2.
3. Mengetahui hubungan antara kadar *very low density lipoprotein* (VLDL) serum dan ekspresi LPL di jaringan otot rangka tikus Wistar model DM tipe 2 setelah pemberian kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB, kombinasi kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB, dan glibenklamid 5 mg/kgBB.

Bab 5. Metode Penelitian

5.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain kuasi-eksperimental *post test only control group*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Gizi Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) UGM, Laboratorium Biologi Molekuler FK UGM, dan Laboratorium Biokimia FK UGM.

Subyek penelitian adalah tikus Wistar jantan berusia 3 bulan dengan berat 200-300 g. Sampel penelitian adalah jaringan otot rangka dan darah dari hewan coba. Besar sampel dihitung dengan rumus Federer, yaitu:

$$(n - 1)(k - 1) \geq 15$$

Dengan n adalah jumlah sampel dan k adalah jumlah kelompok. Karena pada penelitian ini jumlah kelompok yang direncanakan berjumlah 9, maka didapat jumlah minimal sampel untuk masing-masing kelompok sejumlah 3.

Tahap penelitian ini adalah:

1. Tikus Wistar sejumlah 36 ekor diadaptasi selama 1 minggu dan diperiksa kadar glukosa darah puasa.
2. Sejumlah 32 ekor tikus dipilih secara acak untuk diinduksi diabetes melitus (DM) dengan injeksi *streptozotocin* (STZ) dan nikotinamida. Empat ekor sisanya dimasukkan kelompok kontrol sehat (K1).
3. Setelah 7 hari, tikus yang telah diinjeksi STZ-nikotinamida diperiksa kadar glukosa darah puasa. Tikus yang memenuhi kriteria DM dibagi secara acak ke dalam 6 kelompok subyek, yaitu kelompok kontrol DM (K2), kelompok yang diberi kuersetin 5 mg/kg berat badan (K3), kuersetin 20 mg/kg berat badan (K4), dan kuersetin 80 mg/kg berat badan (K5), kelompok kombinasi kuersetin 5 mg/kg berat badan dan glibenklamid 5 mg/kg berat badan (K6), kelompok kombinasi kuersetin 20 mg/kg berat badan dan glibenklamid 5 mg/kg berat badan (K7), kelompok kombinasi kuersetin 80 mg/kg berat badan dan glibenklamid 5 mg/kg berat badan (K8), dan glibenklamid 5 mg/kg berat badan (K9).
4. Kuersetin dan glibenklamid diberikan selama 4 minggu, kadar glukosa dan kadar kolesterol VLDL (*very low density lipoprotein*) serum seluruh kelompok dihitung.
5. Tikus didekapitasi dan dilakukan persiapan pengambilan jaringan.
6. Jaringan otot diambil untuk diperiksa ekspresi lipoprotein lipase (LPL).

5.2. Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini adalah:

1. Variabel bebas:
 - a. Kuersetin.

- b. Glibenklamid.
- 2. Variabel terikat:
 - a. Ekspresi LPL.
 - b. Kadar trigliserida serum.
- 3. Variabel terkontrol.
 - a. Jenis kelamin.
 - b. Usia.
 - c. Berat badan.
 - d. Pakan hewan.
 - e. Kadar glukosa darah puasa.

5.3. Definisi Operasional

1. Tikus DM.
Tikus diinduksi DM bila setelah diinjeksi STZ dengan dosis 60 mg/kg berat badan dan nikotinamida 120 mg/kg berat badan. Tikus dinyatakan DM bila kadar glukosa darah puasa ≥ 126 mg/dL (Barik *et al*, 2008).
2. Kuersetin.
Kuersetin yang digunakan adalah kuersetin dalam bentuk bubuk yang dilarutkan dalam *carboxymethyl cellulose* (CMC) 0,5% (Nanjundan *et al.*, 2009). Kuersetin diberikan per sondase dengan dosis berbeda selama 4 minggu. Kelompok K3 mendapat dosis 10 mg/kg berat badan, K4 mendapat dosis 20 mg/kg berat badan, dan K5 mendapat dosis 80 mg/kg berat badan.
3. Glibenklamid.
Glibenklamid yang digunakan dalam bentuk larutan, dilarutkan dalam CMC 0.5% dan diberikan per sondase. Kelompok K6 mendapat kombinasi kuersetin-glibenklamid dengan dosis kuersetin 5 mg/kg berat badan dan glibenklamid 5 mg/kg berat badan. Kelompok K7 mendapat kombinasi kuersetin-glibenklamid dengan dosis kuersetin 20 mg/kg berat badan dan glibenklamid 5 mg/kg berat badan. Kelompok K8 mendapat kombinasi kuersetin-glibenklamid dengan dosis kuersetin 80 mg/kg berat badan dan glibenklamid 5 mg/kg berat badan. Kelompok K9 mendapat glibenklamid 5 mg/kg berat badan.
4. Kelompok kontrol.
Yang termasuk kelompok kontrol adalah K1 (tikus sehat) dan K2 (tikus DM). Kedua kelompok mendapat plasebo, yaitu larutan CMC 0,5%.
5. Berat badan tikus.
Berat badan tikus ditimbang setiap minggu dengan menggunakan timbangan digital. Berat badan dinyatakan dalam g.

6. Kadar glukosa darah puasa.

Kadar glukosa darah puasa diperiksa dengan menggunakan sampel plasma tikus yang dipuasakan semalam. Nilai absorbansi sampel yang telah direaksikan dengan reagen diukur dengan menggunakan spektrofotometer dan hasilnya dimasukkan dalam rumus:

$$\text{Kadar glukosa darah} = \frac{S-B}{St-B} \times 100 \text{ mg/dL}$$

Keterangan:

S: hasil pembacaan sampel.

B: hasil pembacaan blanko.

St: hasil pembacaan standar.

7. Kadar kolesterol VLDL serum.

Kadar VLDL dihitung dengan menggunakan rumus pada penelitian Ren *et al.* (2010):

$$[\text{VLDL}] = [\text{Kolesterol total}] - \{[\text{HDL}] + [\text{LDL}]\}$$

Keterangan:

[VLDL] : kadar VLDL serum.

[Kolesterol total] : kadar kolesterol total serum.

[HDL] : kadar HDL serum.

[LDL] : kadar LDL serum.

Kadar VLDL serum dinyatakan dalam mg/dL.

8. Kadar kolesterol total serum.

Kadar kolesterol total serum diperiksa dengan mengukur absorbansi sampel yang telah direaksikan dengan reagen dan hasilnya dimasukkan dalam rumus:

$$\text{Kadar kolesterol total serum} = \frac{S-B}{St-B} \times 200 \text{ mg/dL}$$

Keterangan:

S: hasil pembacaan sampel.

B: hasil pembacaan blanko.

St: hasil pembacaan standar.

9. Kadar kolesterol HDL serum.

Kadar HDL serum diperiksa dengan mengukur absorbansi sampel yang telah direaksikan dengan reagen dan hasilnya dimasukkan dalam rumus:

$$\text{Kadar HDL serum} = \frac{S-B}{St-B} \times 200 \text{ mg/dL}$$

Keterangan:

S: hasil pembacaan sampel.

B: hasil pembacaan blanko.

St: hasil pembacaan standar.

10. Kadar kolesterol LDL serum.

Kadar LDL serum diperiksa dengan reaksi enzimatis dan pengukuran absorbansi sampel, kemudian terlebih dahulu dihitung kadar kolesterol supernatan dengan rumus:

$$\text{Kadar kolesterol supernatan} = \frac{S-B}{St-B} \times 200 \text{ mg/dL}$$

Hasil perhitungan kadar kolesterol supernatant digunakan untuk menghitung kadar LDL serum dengan rumus:

$$\text{Kadar LDL serum} = \text{kadar kolesterol total} - \text{kadar kolesterol supernatan}$$

11. Ekspresi LPL.

Ekspresi LPL diperiksa dengan metode ELISA untuk menghitung konsentrasi LPL pada sampel. Besaran ekspresi LPL dinyatakan dalam ng/mL.

5.4. Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang dibutuhkan:

1. Pemeliharaan hewan coba:

Kandang hewan, wadah pakan, botol minum, timbangan digital, spuit 5 cc dan jarum 21 G, masker, sarung tangan tebal, sonde.

2. Pengambilan dan penyimpanan darah dan jaringan:

Sarung tangan lateks, tabung mikrohematokrit, pot jaringan, minor set, nitrogen cair, tabung nitrogen, *iced gel pack*, lemari pendingin.

3. Alat laboratorium:

Set spektrofotometer UV-Vis, mesin sentrifugasi, inkubator, vorteks, sonikator, ELISA reader.

4. Alat berbahan gelas dan alat pendukung:

Rak dan tabung reaksi, rak dan tabung mikrosentrifugasi, mikropipet dan tip, pipet tetes, mortar dan *pestle*.

Bahan yang dibutuhkan:

1. Tikus Wistar jantan berusia 3 bulan dengan bobot 200-300 g yang tampak sehat.

2. Penanganan hewan coba:

Pakan hewan AIN-93M, *streptozotocin*, nikotinamida, *carboxymethyl cellulose*, kuersetin, glibenklamid, kloroform.

3. Larutan dapar:

Larutan dapar sitrat, larutan garam fisiologis, larutan *phosphate buffer saline* (PBS), *lysis buffer* Nonidet-P40.

4. Reagen dan kit:

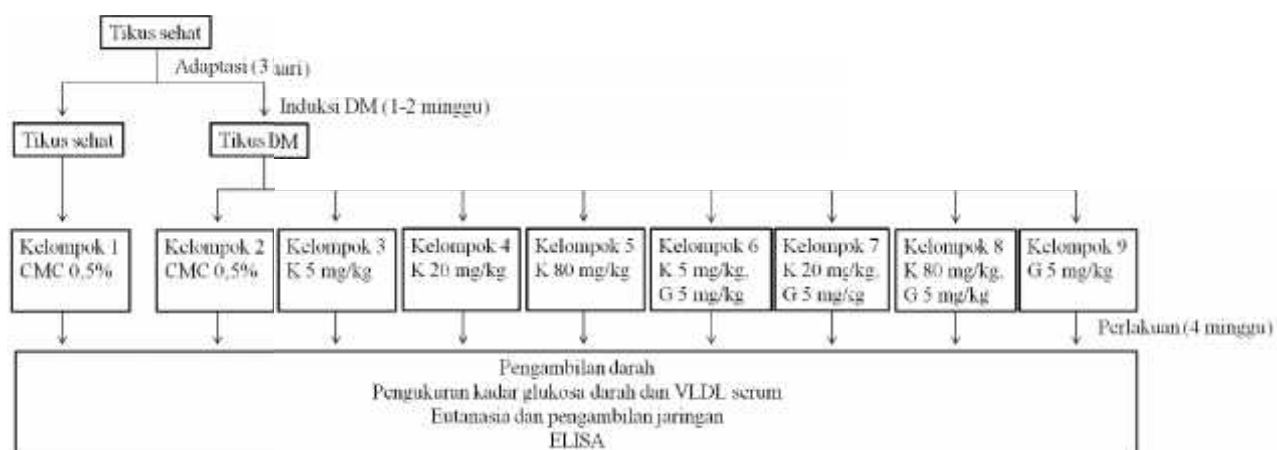
Reagen glukosa GOD-PAP, reagen trigliserida GPO-PAP, *rat lipoprotein lipase* ELISA kit.

5. Bahan pendukung lainnya:

Kapas alkohol, kasa steril, akuades, akuabides, kertas label sampel.

5.5. Jalannya Penelitian

Secara umum, tahapan penelitian ini sesuai dengan alur pada Gambar 8.



Gambar 8. Alur penelitian. CMC adalah *carboxymethyl cellulose*, DM adalah diabetes melitus, K adalah kuesetin, G adalah glibenklamid, VLDL adalah *very low density lipoprotein*, ELISA adalah *enzyme-linked immunsorbent assay*.

5.5.1. Pemeliharaan Hewan Model

Tikus Wistar jantan berusia 3 bulan dengan bobot 200-300 g dipelihara dalam kandang terpisah yang memungkinkan akses pakan AIN-93M dan air *ad libitum*, dalam suhu ruang dan dengan siklus terang-gelap 12 jam. Berat badan tikus ditimbang setiap minggu.

Tikus diberi pakan standar AIN-93M, dengan komposisi tepung jagung, kasein, maltodekstrin, sukrosa, selulosa, minyak kedelai, *mineral mix*, *vitamin mix*, *choline bitartrate*, *L-cystine*, dan tBHQ. Pakan ini mengandung 3,58 kkal/g. Kandungan proteinnya mencapai 12,6%, lemak 4,1%, serat 4,8%, residu tepung 2,2%, kelembaban <10%, dan karbohidrat 67,5% (Bio-Serv). Setiap hari tikus diberi pakan 20 g, dan dihitung sisa pakan setelah 24 jam.

5.5.2. Induksi Diabetes Melitus

Induksi DM tipe 2 dilakukan dengan menyuntikkan *streptozotocin* (STZ) dan nikotinamida secara intraperitoneal pada tikus yang telah dipuasakan semalam (Conn, 2008). *Streptozotocin* dilarutkan dalam larutan dapar sitrat (pH 4,5) dan diberikan dengan

dosis 60 mg/kg BB. Lima belas menit setelah pemberian STZ, diberikan nikotinamida yang dilarutkan dalam larutan garam fisiologis dengan dosis 120 mg/kg BB. Untuk mengonfirmasi DM, kadar glukosa darah puasa diperiksa pada hari ke-7 setelah penyuntikan STZ-nikotinamida. Tikus dinyatakan DM bila kadar glukosa darah puasa \geq 126 mg/dL (Barik *et al.*, 2008).

5.5.3. Pemberian Kuersetin dan Glibenklamid

Kuersetin bubuk dilarutkan dengan CMC 0,5% (Nanjundan *et al.*, 2009). Larutan kuersetin diberikan per sondase dengan dosis berbeda. Kelompok K3 mendapat dosis 5 mg/kg berat badan, K4 mendapat dosis 20 mg/kg berat badan, dan K5 mendapat dosis 80 mg/kg berat badan selama 4 minggu.

Glibenklamid dilarutkan dengan CMC 0,5%. Larutan glibenklamid diberikan per sondase, seperti juga pada pemberian kuersetin. Kelompok K6 diberi kuersetin dengan dosis 5 mg/kg berat badan dan glibenklamid dengan dosis 5 mg/kg berat badan. Kelompok K7 diberi kuersetin dengan dosis 20 mg/kg berat badan dan glibenklamid dengan dosis 5 mg/kg berat badan. Kelompok K8 diberi kuersetin dengan dosis 80 mg/kg berat badan dan glibenklamid dengan dosis 5 mg/kg berat badan. Kelompok K9 mendapat glibenklamid dengan dosis 5 mg/kg berat badan. Dua kelompok yang tidak mendapat kuersetin dan glibenklamid, yaitu kelompok K1 dan K2 mendapat larutan CMC 0,5% sebagai plasebo.

5.5.4. Pengambilan dan Penanganan Sampel Darah

Untuk pemeriksaan glukosa darah puasa, tikus dipuasakan semalam sebelum pengambilan darah. Darah diambil dari sinus retroorbitalis dengan menggunakan tabung mikrohematokrit. Jadwal pengambilan darah adalah:

1. Sebelum induksi DM (hari ke-7 perawatan).
Sampel darah diambil secara acak 2 ekor dari setiap kelompok, dipisahkan plasmanya dan digunakan untuk pemeriksaan kadar glukosa darah puasa.
2. Satu minggu setelah induksi (hari ke-14 perawatan).
Sampel darah diambil dari seluruh hewan coba, dipisahkan plasmanya dan digunakan untuk pemeriksaan kadar glukosa darah puasa.
3. Akhir minggu ke-2 perlakuan.
Sampel darah diambil dari seluruh hewan coba, dipisahkan plasmanya dan digunakan untuk pemeriksaan kadar glukosa darah puasa.
4. Akhir minggu ke-4 perlakuan.

Sampel darah diambil dari seluruh hewan coba, diambil plasma dan serum untuk digunakan pada pemeriksaan kadar glukosa darah puasa (plasma) dan kadar profil lipid serum.

Dalam menyiapkan sampel plasma, sekitar 500 µL sampel darah dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi yang mengandung EDTA, lalu disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 2.000 g. Supernatan diambil dan disimpan pada suhu -20°C (Sawula *et al.*, 2008).

Dalam menyiapkan sampel serum, sekitar 1 mL sampel darah dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi tanpa EDTA, didiamkan selama 3-5 menit, kemudian disentrifugasi selama 5 menit pada 3.500 g. Supernatan diambil dan disimpan pada suhu -20°C.

5.5.5. Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah

Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan dengan metode spektrofotometri. Sebelum absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer, sampel direaksikan berdasarkan dua tahap reaksi enzimatik, yaitu:

- i. reaksi I (dikatalisis oleh glukosa oksidase): $\text{glukosa} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{glukonat} + \text{H}_2\text{O}_2$.
- ii. reaksi II (dikatalisis oleh peroksidase): $2 \text{H}_2\text{O}_2 + \text{fenol} + 4\text{-aminoantipirin} \rightarrow \text{quinoneimine} + 4 \text{H}_2\text{O}$ (Chronolab).

Plasma yang diperoleh diambil sebanyak 10 µL untuk direaksikan dengan reagen glukosa GOD-PAP sebanyak 1 mL. Setelah divorteks selama 5 detik kemudian diinkubasi dalam suhu 37°C selama 10 menit, lalu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm.

5.5.6. Pemeriksaan Kadar Kolesterol Total Serum

Untuk memeriksa kadar kolesterol total serum setiap sampel, masing-masing 10 µL serum ditambahkan 1.000 µL reagen pengendap kolesterol. Untuk membuat blanko, 1.000 µL reagen pengendap kolesterol ditambahkan dengan 10 µL akuades. Standar dibuat dengan menggunakan 10 µL larutan standar ditambah 1.000 µL reagen pengendap. Seluruh campuran diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C, kemudian dilakukan pembacaan absorbansi pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm. Penghitungan kadar kolesterol total dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kadar kolesterol total serum} = \frac{S-B}{St-B} \times 200 \text{ mg/dL}$$

Keterangan:

S: hasil pembacaan sampel.

B: hasil pembacaan blanko.

St: hasil pembacaan standar.

5.5.7. Pemeriksaan Kadar HDL Serum

Untuk memeriksa kadar HDL serum setiap sampel, masing-masing 200 µL serum ditambahkan 1.000 µL reagen pengendap HDL. Standar dibuat dengan menggunakan 200 µL larutan standar ditambah 1.000 µL reagen pengendap HDL. Seluruh campuran diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar, kemudian disentrifugasi pada 2.500 g selama 20 menit. Masing-masing supernatan diambil sebanyak 100 µL dan dicampur dengan 1.000 µL reagen kolesterol. Campuran diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar kemudian dilakukan pembacaan absorbansi pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm. Penghitungan kadar HDL dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kadar HDL serum} = \frac{S-B}{St-B} \times 200 \text{ mg/dL}$$

Keterangan:

S: hasil pembacaan sampel.

B: hasil pembacaan blanko.

St: hasil pembacaan standar.

5.5.8. Pemeriksaan Kadar LDL Serum

Untuk memeriksa kadar LDL serum setiap sampel, masing-masing 100 µL serum ditambahkan dengan 1.000 µL reagen pengendap LDL. Campuran diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar kemudian disentrifugasi selama 20 menit pada 2.500 g. Standar dibuat dengan melarutkan standar kolesterol dalam larutan garam fisiologis dengan rasio 1 : 10. Masing-masing supernatan sampel dan standar diambil sebanyak 100 µL dan dicampur dengan 1.000 µL reagen kolesterol. Campuran diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar atau 5 menit pada 37°C kemudian dilakukan pembacaan absorbansi pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm. Hasil pembacaan dimasukkan dalam rumus:

$$\text{Kadar kolesterol supernatan} = \frac{S-B}{St-B} \times 200 \text{ mg/dL}$$

Keterangan:

S: hasil pembacaan sampel.

B: hasil pembacaan blanko.

St: hasil pembacaan standar.

Hasil perhitungan kadar kolesterol supernatan digunakan untuk menghitung kadar LDL serum dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kadar LDL serum} = \text{kadar kolesterol total} - \text{kadar kolesterol supernatan}$$

5.5.9. Pengambilan dan Penanganan Sampel Jaringan

Dalam pengambilan jaringan, tikus terlebih dahulu dieutanasia. Prosedur eutanasia dilakukan dengan teknik dislokasi servikal di bawah pengaruh anestesi-sedasi dengan menggunakan injeksi intraperitoneal ketamin HCl 0,2 mL. Setelah tikus didislokasi servikal, jaringan otot (m. soleus) dibebaskan dari jaringan sekitar secepatnya, bila memungkinkan dalam es. Masukkan dalam pot jaringan dan bekukan dengan menggunakan nitrogen cair. Simpan dalam suhu -80°C atau simpan dalam es untuk dihomogenasi segera dengan metode kombinasi *cryogenic grinding*-sonikasi.

Sampel beku digiling di mortar dengan nitrogen cair. Mortar terlebih dahulu dibersihkan dan diletakkan di termos atau kotak *stryrofoam*. Nitrogen cair dituang ke mortar dan ditunggu hingga terbentuk kabut di sekitar mortar. Sampel beku dimasukkan ke dalam mortar. Bila sampel berasal dari lemari pendingin -80°C , biarkan sesaat hingga sampel lebih dingin. Sampel digiling dengan gerakan memutar. Sampel yang telah dihaluskan kemudian diproses dengan sonikator dalam *lysis buffer* (Burden, 2012). Homogenat disentrifugasi dan supernatan digunakan untuk analisis ekspresi LPL dengan metode ELISA.

5.5.10. Pemeriksaan Ekspresi Lipoprotein Lipase

a. Preparasi reagen.

Standar dicampur dengan pelarut standar sebanyak 1 mL, diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, dikocok perlahan. Konsentrasi awal standar ini adalah 100 ng/mL, kemudian diencerkan menjadi 20 ng/mL; 10 ng/mL; 5 ng/mL; 2,5 ng/mL; 1,25 ng/mL; 0,625 ng/mL; dan 0,312 ng/mL. Untuk konsentrasi 0 ng/mL, pelarut standar digunakan sebagai blanko. Enam mL pelarut A diencerkan dengan 6 mL akuades dan 6 mL pelarut B diencerkan dengan 6 mL akuades. Reagen deteksi A dan B disentrifugasi sesaat sebelum digunakan kemudian dicampur dengan hasil pengenceran pelarut A dan B (reagen deteksi A dengan pelarut A dan reagen deteksi B dengan pelarut B) dengan perbandingan 1:100. Larutan pencuci sebanyak 20 mL dilarutkan dengan 580 mL akuades.

b. Preparasi sampel.

Sampel diencerkan dengan 0,02 mL/L PBS pH 7,0-7,2. Untuk sampel plasma digunakan pengenceran 100 kali.

c. Prosedur ELISA.

Pada prosedur ini akan dilakukan pemeriksaan duplo dengan 8 konsentrasi standar. Masing-masing 100 μL standar dan sampel dimasukkan ke sumuran yang sesuai, kemudian *plate* ditutup dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu

37°C. Setelah diinkubasi, cairan dibuang, kemudian 100 µL reagen deteksi A hasil pengenceran dimasukkan ke masing-masing sumuran dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C dalam keadaan tertutup. Larutan kemudian diaspirasi dan dicuci dengan 350 µL larutan pencuci hasil pengenceran, kemudian didiamkan selama 1-2 menit. Sisa cairan dibersihkan dengan menggunakan kertas serap. Sumuran dicuci sebanyak 3 kali. Kemudian 100 µL reagen deteksi B hasil pengenceran ditambahkan ke masing-masing sumuran dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dalam keadaan tertutup. Setelah inkubasi, sumuran dicuci sebanyak 5 kali. Kemudian larutan substrat 90 µL ditambahkan ke setiap sumuran, dan *plate* ditutupi dengan penutup yang baru. Setelah itu, *plate* diinkubasi selama 15-25 menit pada suhu 37°C. Inkubasi pada tahap ini tidak boleh melebihi 30 menit dan dilakukan dalam lingkungan yang terlindung dari cahaya. Setelah inkubasi, larutan stop 50 µL ditambahkan ke setiap sumuran sambil dipastikan bahwa larutan tercampur merata. Sisa air dan sidik jari di dasar *plate* dibersihkan kemudian dilakukan pembacaan pada panjang gelombang 450 nm (Usn Life Science, Inc.).

5.6. Analisis Hasil

Data disajikan secara deskriptif dalam bentuk naratif, tabular, dan grafikal. Normalitas sebaran data diperiksa dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk. Data dengan sebaran normal ditampilkan sebagai rerata \pm simpang baku. Uji statistik parametrik untuk data numerikal dilakukan dengan menggunakan *one way* ANOVA, kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc* Tukey HSD bila didapatkan perbedaan bermakna. Korelasi dua kelompok data numerik dengan distribusi normal diuji dengan uji Pearson.

Bila sebaran data tidak normal, dilakukan transformasi data. Uji statistik nonparametrik dilakukan bila transformasi data tidak berhasil. Uji statistik nonparametrik untuk data rasio dilakukan dengan menggunakan Kruskal-Wallis. Bila dengan uji Kruskal-Wallis didapatkan perbedaan bermakna, analisis data dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney. Korelasi dua kelompok data numerik tanpa persebaran normal diuji dengan uji Spearman.

Bab 6. Jadwal Pelaksanaan

Tabel 5. Jadwal penelitian.

No.	Kegiatan	Bulan					
		I	II	III	IV	V	VI
1.	Penyediaan pakan, kuersetin dan reagen, serta pengurusan etik penelitian	X	X	X			
2.	Adaptasi populasi		X				
3.	Induksi DM		X				
4.	Pemeriksaan glukosa darah		X		X		
5.	Administrasi kuersetin		X	X			
6.	Uji eksperimental jaringan sampel				X		
7.	Analisis statistik				X		
8.	Interpretasi data				X		
9.	Penyusunan laporan dan naskah publikasi					X	
10.	Seminar						X
11.	Perbaikan laporan						X

Bab 7. Hasil Penelitian

7.1. Pengumpulan Data

Proses pengumpulan data berlangsung dalam rentang waktu Februari-Oktober 2013 di Program Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada dan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Sampel darah dan jaringan yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari sampel dari penelitian sebelumnya oleh tim peneliti yang sama.

Dua puluh tujuh ekor tikus Wistar jantan berusia 3 bulan dengan berat badan 200-300 g dan kadar glukosa darah puasa < 126 mg/dL digunakan sebagai subyek penelitian. Tiga ekor dikelompokkan dalam Kelompok 1 (tikus normal yang mendapat plasebo) dan sisanya diinjeksi dengan *streptozotocin* (STZ) 60 mg/kg berat badan (BB)-nikotinamida 120 mg/kgBB untuk menginduksi diabetes melitus (DM). Setelah kadar glukosa darah puasa ≥ 126 mg/dL, tikus dikelompokkan secara acak dalam jumlah merata dalam Kelompok 2 (tikus DM yang mendapat plasebo), Kelompok 3 (tikus DM yang mendapat kuersetin 5 mg/kgBB), Kelompok 4 (tikus DM yang mendapat kuersetin 20 mg/kgBB), Kelompok 5 (tikus DM yang mendapat kuersetin 80 mg/kgBB), Kelompok 6 (tikus DM yang mendapat kombinasi kuersetin 5 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB), Kelompok 7 (tikus DM yang mendapat kombinasi kuersetin 20 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB), Kelompok 8 (tikus DM yang mendapat kombinasi 80 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB), dan Kelompok 9 (tikus DM yang mendapat glibenklamid 5 mg/kgBB).

Data yang terkumpul merupakan data kuantitatif berupa BB sebelum dan setelah perlakuan, rerata asupan kalori harian selama masa perlakuan, kadar glukosa darah puasa (GDP) sebelum dan setelah perlakuan, kadar *very low density lipoprotein* (VLDL) setelah perlakuan, dan kadar lipoprotein lipase (LPL) jaringan otot rangka setelah perlakuan.

Kesulitan yang dialami selama penelitian adalah angka keberhasilan induksi DM dengan STZ-nikotinamida dan waktu yang dibutuhkan untuk mencapai target kadar GDP. Hanya setengah dari total hewan coba yang mencapai kadar GDP target dalam waktu 1 minggu, dan sisanya dicapai dalam waktu 3 minggu setelah injeksi STZ-nikotinamida. Hal ini mempengaruhi ketahanan hidup hewan coba hingga akhir masa perlakuan, hanya sebagian kecil hewan yang baru dinyatakan DM setelah 3 minggu diinduksi yang dapat bertahan hidup hingga akhir masa perlakuan.

7.2. Berat Badan

Walaupun di awal penelitian tikus dipilih dengan kriteria berat badan 200-300 g, namun tikus mengalami penurunan berat badan selama masa induksi DM. Hasil

pengukuran berat badan seluruh kelompok sebelum dan setelah perlakuan dapat dilihat pada Tabel 6.

Tujuh kelompok mengalami penurunan berat badan, sedangkan dua kelompok, yaitu kelompok kuersetin 5 mg/kgBB dan kelompok kuersetin 80 mg/kgBB, mengalami peningkatan berat badan. Uji t berpasangan data berat badan sebelum dan setelah perlakuan menunjukkan hanya kelompok kuersetin 80 mg/kgBB-glibenklamid yang menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$).

Tabel 6. Berat badan sebelum dan setelah perlakuan.

Kelompok	n	Berat badan I (g)	Berat badan II (g)	p
Tikus normal + plasebo	3	217,00 ± 15,72	207,33 ± 14,19	0,518
Tikus DM + plasebo	3	204,00 ± 14,53	198,67 ± 33,53	0,675
Tikus DM + kuersetin 5 mg/kgBB	3	219,67 ± 56,36	244,67 ± 74,63	0,157
Tikus DM + kuersetin 20 mg/kgBB	3	217,67 ± 22,50	176,33 ± 54,90	0,159
Tikus DM + kuersetin 80 mg/kgBB	3	217,67 ± 30,67	225,33 ± 72,21	0,780
Tikus DM + kuersetin 5 mg/kgBB-glibenklamid	3	199,67 ± 10,69	187,00 ± 22,07	0,346
Tikus DM + kuersetin 20 mg/kgBB-glibenklamid	3	201,00 ± 28,21	188,33 ± 42,71	0,475
Tikus DM + kuersetin 80 mg/kgBB-glibenklamid	3	192,00 ± 9,64	171,00 ± 5,57	0,014 ^a
Tikus DM + glibenklamid 5 mg/kgBB	3	212,00 ± 7,94	189,00 ± 27,62	0,272
p		0,748*	0,585**	

Sebaran data diuji dengan Shapiro-Wilk: $p \geq 0,05$. Data disajikan dalam rerata ± simpang baku.

Berat badan I adalah berat badan sebelum perlakuan dan berat badan II adalah berat badan setelah perlakuan. DM adalah diabetes melitus.

*Uji Kruskal-Wallis: $p \geq 0,05$.

**Uji one-way ANOVA: $p \geq 0,05$.

Notasi ^a menunjukkan perbedaan signifikan berdasarkan uji T berpasangan ($p < 0,05$).

7.3. Rerata Asupan Pakan Harian

Selama masa perlakuan, berat pakan yang dikonsumsi dalam 24 jam dihitung setiap hari. Hasil perhitungan asupan pakan harian kemudian dirata-ratakan untuk mendapatkan nilai rerata asupan pakan harian. Rerata asupan pakan harian dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Rerata asupan pakan harian hewan coba selama 4 minggu masa perlakuan.

Kelompok	n	Asupan Pakan Harian (Kal)	p
Tikus normal + plasebo	3	11,09 ± 2,07 ^a	0,004*
Tikus DM + plasebo	3	18,89 ± 2,35 ^b	
Tikus DM + kuersetin 5 mg/kgBB	3	15,46 ± 0,91	
Tikus DM + kuersetin 20 mg/kgBB	3	17,27 ± 0,73 ^b	
Tikus DM + kuersetin 80 mg/kgBB	3	16,48 ± 2,79	
Tikus DM + kuersetin 5 mg/kgBB-glibenklamid	3	18,78 ± 0,65 ^b	
Tikus DM + kuersetin 20 mg/kgBB-glibenklamid	3	17,76 ± 1,63 ^b	
Tikus DM + kuersetin 80 mg/kgBB-glibenklamid	3	16,37 ± 3,33	
Tikus DM + glibenklamid 5 mg/kgBB	3	18,73 ± 1,53 ^b	

Sebaran data diuji dengan Shapiro-Wilk: $p \geq 0,05$. Data disajikan dalam rerata ± simpang baku.

DM adalah diabetes melitus.

*Uji *one-way* ANOVA: $p < 0,05$.

Uji *post hoc* Tukey HSD dengan hasil signifikan ditandai dengan notasi ^a dan ^b. Notasi ^a memiliki perbedaan bermakna dengan notasi ^b ($p < 0,05$).

Rerata asupan pakan harian terendah ditemukan pada kelompok tikus normal yang mendapat plasebo dan rerata tertinggi ditemukan pada kelompok tikus DM yang mendapat plasebo. Uji *one-way* ANOVA menunjukkan perbedaan rerata asupan pakan harian antar kelompok yang signifikan dan uji *post hoc* Tukey HSD menunjukkan perbedaan signifikan tersebut ditemukan antara kelompok tikus normal yang mendapat plasebo dengan kelompok tikus DM yang mendapat plasebo, kuersetin 20 mg/kgBB, kuersetin 5 mg/kgBB-glibenklamid, kuersetin 20 mg/kgBB-glibenklamid, dan glibenklamid 5 mg/kgBB.

7.4. Kadar Glukosa Darah Puasa

Kadar GDP diperiksa sebelum dan setelah perlakuan. Hasil pemeriksaan dapat dilihat pada Tabel 8. Tujuh kelompok mengalami penurunan kadar GDP, sedangkan dua kelompok, yaitu kelompok tikus DM yang mendapat plasebo dan kelompok kuersetin 20 mg/kgBB, mengalami peningkatan kadar GDP, namun perbedaan kadar GDP sebelum dan setelah perlakuan ini tidak signifikan.

Tabel 8. Kadar glukosa darah puasa sebelum dan setelah perlakuan.

Kelompok	n	GDP I (mg/dL)	GDP II (mg/dL)	p^*
Tikus normal + plasebo	3	82,32 ± 15,31 ^a	65,71 ± 22,05	0,310
Tikus DM + plasebo	3	171,37 ± 13,61 ^{bc}	346,68 ± 137,75	0,153
Tikus DM + kuersetin 5 mg/kgBB	3	153,90 ± 39,11 ^{be}	111,21 ± 35,53	0,422
Tikus DM + kuersetin 20 mg/kgBB	3	140,96 ± 11,52 ^{bdg}	205,42 ± 107,59	0,382
Tikus DM + kuersetin 80 mg/kgBB	3	273,54 ± 177,17 ^b	142,52 ± 81,65	0,396
Tikus DM + kuersetin 5 mg/kgBB-glibenklamid	3	283,79 ± 94,48 ^{bh}	164,11 ± 58,09	0,307
Tikus DM + kuersetin 20 mg/kgBB-glibenklamid	3	290,38 ± 75,74 ^{bdth}	238,58 ± 162,18	0,733
Tikus DM + kuersetin 80 mg/kgBB-glibenklamid	3	337,21 ± 151,38 ^{bh}	189,09 ± 31,09	0,290
Tikus DM + glibenklamid 5 mg/kgBB	3	182,77 ± 47,38 ^b	110,09 ± 49,05	0,304
p		0,039**	0,065***	

Sebaran data diuji dengan Shapiro-Wilk: $p \geq 0,05$. Data disajikan dalam rerata ± simpang baku.

GDP I adalah kadar glukosa darah puasa 1 hari sebelum perlakuan dan GDP II adalah kadar glukosa darah puasa setelah 4 minggu perlakuan. DM adalah diabetes melitus.

*Uji T berpasangan: $p \geq 0,05$.

**Uji Kruskal-Wallis GDP I: $p < 0,05$. Uji *post hoc* Mann-Whitney U: $p \geq 0,05$; komparasi ^a dan ^b, ^c dan ^d, ^e dan ^f, ^g dan ^h menunjukkan nilai $p = 0,05$.

***Uji Kruskal-Wallis GDP II: $p \geq 0,05$.

7.5. Kadar Very Low Density Lipoprotein Serum

Kadar *very low density lipoprotein* (VLDL) yang digunakan pada penelitian ini adalah selisih antara kolesterol total dengan akumulasi *high density lipoprotein* (HDL) dan *low density lipoprotein* (LDL), sesuai dengan rumus pada penelitian Ren *et al.* (2010). Hasil perhitungan VLDL dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Kadar *very low density lipoprotein* serum setelah perlakuan.

Kelompok	n	Kadar VLDL (mg/dL)	p
Tikus normal + plasebo	3	9,05 ± 2,86	0,287*
Tikus DM + plasebo	3	24,23 ± 5,06	
Tikus DM + kuersetin 5 mg/kgBB	3	12,21 ± 5,60	
Tikus DM + kuersetin 20 mg/kgBB	3	24,84 ± 6,83	
Tikus DM + kuersetin 80 mg/kgBB	3	6,19 ± 2,30	
Tikus DM + kuersetin 5 mg/kgBB-glibenklamid	3	8,19 ± 0,96	
Tikus DM + kuersetin 20 mg/kgBB-glibenklamid	3	24,73 ± 16,55	
Tikus DM + kuersetin 80 mg/kgBB-glibenklamid	3	6,94 ± 1,13	
Tikus DM + glibenklamid 5 mg/kgBB	3	16,02 ± 10,27	

Sebaran data diuji dengan Shapiro-Wilk. Data disajikan dalam rerata ± *standard error of mean*.

VLDL adalah *very low density lipoprotein*. DM adalah diabetes melitus.

*Uji *one way* ANOVA: $p \geq 0,05$.

7.6. Kadar Lipoprotein Lipase Jaringan Otot Rangka

Kadar LPL pada homogenat 100 mg *m. soleus* diperiksa dengan metode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Hasil pemeriksaan dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Kadar LPL *m. soleus* setelah perlakuan.

Kelompok	n	Kadar LPL (ng/g)	p
Tikus normal + plasebo	3	3.704,83 ± 1.318,33	0,099*
Tikus DM + plasebo	3	3.360,84 ± 1.235,91	
Tikus DM + kuersetin 5 mg/kgBB	3	4.004,38 ± 1.199,44	
Tikus DM + kuersetin 20 mg/kgBB	3	6.472,01 ± 797,45	
Tikus DM + kuersetin 80 mg/kgBB	3	5.593,16 ± 462,51	
Tikus DM + kuersetin 5 mg/kgBB-glibenklamid	3	4.669,18 ± 54,24	
Tikus DM + kuersetin 20 mg/kgBB-glibenklamid	3	7.223,82 ± 1.498,61	
Tikus DM + kuersetin 80 mg/kgBB-glibenklamid	3	6.974,35 ± 746,82	
Tikus DM + glibenklamid 5 mg/kgBB	3	7.515,60 ± 1.772,879	

Sebaran data diuji dengan Shapiro-Wilk. Data disajikan dalam rerata ± *standard error of mean*.

LPL adalah lipoprotein lipase, diperiksa dari homogenat 100 mg jaringan *m. soleus*. DM adalah diabetes melitus.

*Uji *one way* ANOVA: $p \geq 0,05$.

Uji *one-way* ANOVA tidak menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok. Kadar LPL kelompok tikus DM yang mendapat plasebo lebih rendah dari kelompok tikus normal yang mendapat plasebo. Di antara 7 kelompok DM lainnya, kadar tertinggi

ditemukan pada kelompok glibenklamid 5 mg/kgBB, sedangkan kadar terendah ditemukan pada kelompok kuersetin 5 mg/kgBB.

Tabel 11. Uji korelasi kadar VLDL serum dan kadar LPL.

		Kadar LPL <i>m. soleus</i>
Kadar VLDL serum	Koefisien korelasi	0,188
	<i>p</i>	0,347
	<i>n</i>	27

VLDL adalah *very low density lipoprotein*. LPL adalah lipoprotein lipase.

Uji korelasi Pearson digunakan untuk melihat hubungan antara kadar LPL *m. soleus* dan kadar VLDL serum. Berdasarkan uji Pearson diketahui korelasi keduanya sangat lemah dan tidak bermakna (Tabel 10).

Bab 8. Pembahasan

8.1. Berat Badan

Berdasarkan data berat badan pada Tabel 6 diketahui bahwa tujuh kelompok mengalami penurunan berat badan, sedangkan dua kelompok, yaitu kelompok kuersetin 5 mg/kgBB dan kelompok kuersetin 80 mg/kgBB, mengalami peningkatan berat badan. Uji t berpasangan data berat badan sebelum dan setelah perlakuan menunjukkan hanya kelompok kuersetin 80 mg/kgBB-glibenklamid yang menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$).

Pada diabetes melitus (DM) yang belum terkontrol dapat ditemukan penurunan berat badan yang dialami oleh tikus pada kelompok-kelompok DM dapat disebabkan oleh peningkatan katabolisme karbohidrat, lipid, dan protein (Akbarzadeh *et al.*, 2007; Maciel *et al.*, 2013; Sheela *et al.*, 2013), seperti yang terjadi pada manusia. Penelitian ini juga menunjukkan penurunan berat badan terjadi pada kelompok-kelompok tikus DM dengan kadar glukosa darah puasa (GDP) yang belum terkontrol.

Walaupun kuersetin dapat menyebabkan penurunan berat badan (Aguirre *et al.*, 2011), namun tampaknya penurunan berat badan pada penelitian ini tidak disebabkan oleh pemberian kuersetin karena tidak terdapat perbedaan berat badan yang signifikan antar kelompok setelah perlakuan. Machha *et al.* (2007) juga menemukan hasil yang sama, yaitu tidak terdapat perbedaan berat badan yang signifikan antara tikus DM yang diberi kuersetin dengan tikus kontrol DM.

Penurunan berat badan juga dapat disebabkan oleh rendahnya asupan pakan, namun faktor ini tidak ditemukan pada kelompok tikus DM. Sebaliknya, tampaknya faktor inilah yang berperan dalam terjadinya penurunan berat badan pada kelompok tikus normal yang mendapat plasebo.

Dari 9 kelompok subyek terdapat 2 kelompok yang mengalami peningkatan berat badan. Peningkatan berat badan kemungkinan disebabkan oleh pertumbuhan normal tikus. Tikus dapat mengalami penambahan berat badan hingga 500 g meskipun telah mencapai usia dewasa (Smith *and* Mangkoewidjojo, 1988).

Peningkatan berat badan juga dapat disebabkan oleh perbaikan kontrol glikemik. Bila kadar glukosa darah pada DM telah terkontrol maka laju katabolisme akan menurun. Pada kelompok tikus DM yang mendapat kuersetin 5 mg/kgBB terjadi penurunan kadar GDP hingga mencapai kadar normal. tampaknya hal ini juga berperan dalam menyebabkan terjadinya peningkatan berat badan pada kelompok ini.

8.2. Rerata Asupan Pakan Harian

Data asupan pakan harian pada Tabel 7 menunjukkan kelompok tikus normal memiliki asupan terendah. Uji *one-way* ANOVA dan *post hoc* Tukey HSD menunjukkan

perbedaan bermakna antara kelompok tikus normal dengan kelompok tikus DM yang mendapat plasebo, kuersetin 20 mg/kgBB, kuersetin 5 mg/kgBB-glibenklamid, kuersetin 20 mg/kgBB-glibenklamid, dan glibenklamid 5 mg/kgBB. Kebutuhan pakan tikus normal adalah 10% berat badan bila menggunakan pakan kering (Smith *and* Mangkoewidjojo, 1988). Pada penelitian ini, jumlah pakan yang dikonsumsi oleh kelompok tikus normal yang mendapat plasebo relatif rendah bila dibandingkan dengan berat badan selama perlakuan sehingga tampaknya hal inilah yang menyebabkan penurunan berat badan pada kelompok ini. Rendahnya berat badan pada kelompok ini tidak disebabkan oleh adanya penyakit karena berdasarkan pengamatan harian seluruh tikus normal tidak menunjukkan perubahan perilaku dan tidak terdapat kelainan rongga mulut yang dapat mengganggu gerakan mengunyah dan menelan makanan.

Seluruh kelompok tikus DM mengonsumsi 39-70% pakan lebih banyak dari kelompok tikus normal yang mendapat plasebo dengan asupan tertinggi ditemukan pada kelompok tikus DM yang mendapat plasebo. Asupan yang lebih tinggi ini tampaknya disebabkan oleh polifagia yang ditemukan pada keadaan DM (ADA, 2012). Hasil yang sama juga ditemukan pada penelitian Babujanarthanam *et al.* (2011), yaitu asupan pakan tikus kontrol DM lebih tinggi dari tikus kontrol normal. Penelitian yang sama juga menunjukkan kuersetin dapat menurunkan asupan pakan, namun hasil yang sama tidak ditemukan pada penelitian ini karena tidak ditemukan adanya perbedaan asupan pakan yang signifikan antar kelompok DM.

8.3. Kadar Glukosa Darah Puasa

Seperti yang terlihat pada Tabel 8, 7 kelompok mengalami penurunan kadar GDP, sedangkan 2 kelompok, yaitu kelompok tikus DM yang mendapat plasebo dan kelompok kuersetin 20 mg/kgBB, mengalami peningkatan kadar GDP, namun perbedaan kadar GDP sebelum dan setelah perlakuan ini tidak signifikan.

Penurunan kadar GDP pada kelompok tikus normal tampaknya merupakan variasi normal kadar GDP, sedangkan penurunan kadar GDP pada 6 kelompok DM dapat disebabkan oleh kemampuan kuersetin dalam menghambat α -glukosidase sehingga menghambat pemecahan pati sehingga menurunkan absorpsi karbohidrat. Kuersetin juga dapat meningkatkan kadar adiponektin plasma sehingga memperbaiki resistansi insulin sehingga menyebabkan peningkatan ambilan glukosa oleh jaringan-jaringan yang sensitif insulin yang berefek pada penurunan kadar glukosa darah (Jeong *et al.*, 2012).

Penelitian Jeong *et al.* (2012) juga menemukan bahwa pemberian kuersetin dosis rendah (setara dengan 7-14 mg/kgBB perhari) selama 6 minggu dapat menurunkan kadar glukosa plasma. Penurunan ini sesuai dengan peningkatan dosis. Data pada Tabel 8 menunjukkan bahwa seluruh kelompok kombinasi kuersetin-glibenklamid mengalami

penurunan GDP setelah perlakuan selama 4 minggu, berbeda dengan kelompok-kelompok yang hanya mendapat kuersetin. Hal ini dapat berarti kombinasi kuersetin-glibenklamid lebih berpotensi dalam mengontrol kadar GDP, terutama karena peran glibenklamid dalam meningkatkan sekresi insulin sehingga menurunkan kadar glukosa darah.

Peningkatan kadar GDP pada kelompok tikus DM yang mendapat plasebo menunjukkan kondisi DM yang belum terkontrol. Proses katabolisme, seperti lipolisis dan proteolisis, yang terus berlanjut pada DM yang belum terkontrol menyebabkan kadar glukosa darah tetap tinggi (Akbarzadeh *et al.*, 2007; Maciel *et al.*, 2013; Sheela *et al.*, 2013). Kelompok tikus yang mendapat kuersetin 20 mg/kgBB juga mengalami peningkatan kadar GDP walaupun tidak sebesar peningkatan kadar GDP kelompok tikus DM yang mendapat plasebo. Hal ini mungkin disebabkan durasi perlakuan yang relatif singkat dan rendahnya dosis kuersetin yang diberikan.

8.4. Kadar Very Low Density Lipoprotein Serum

Kadar VLDL pada penelitian ini dihitung dari sampel darah puasa. Pada keadaan puasa, kadar VLDL normal berada pada rentang 17,7 – 106,2 mg/dL (Bonow *et al.*, 2012). Pada DM yang tidak terkontrol dapat ditemukan peningkatan kadar trigliserida, kolesterol, lipoprotein, dan asam lemak bebas. Hipertrigliseridemia disebabkan oleh peningkatan kilomikron dan VLDL akibat defisiensi insulin dan restriksi terkait LPL (Unger *and* Foster, 1998). Pada DM tipe 2 cenderung terjadi produksi VLDL yang berlebihan. Hal ini dapat terjadi akibat interaksi antara hiperglikemia dan defek genetik. Pada DM 2 juga dapat ditemukan adanya gangguan bersihan VLDL sehingga meningkatkan kadar VLDL dalam darah (Howard, 1987). Seluruh kelompok memiliki kadar VLDL puasa dalam rentang rendah-normal, namun kadar VLDL pada kelompok tikus DM yang mendapat plasebo lebih tinggi dari kelompok normal yang mendapat plasebo, walaupun peningkatan ini tidak signifikan. Hal ini mungkin disebabkan oleh dosis *streptozotocin* (STZ)-nikotinamida yang digunakan tidak mencukupi untuk menyebabkan abnormalitas kadar VLDL serum dan dislipidemia diabetikum dalam waktu 5 minggu. Selain itu kemungkinan adanya variasi genetik antar individu dalam memetabolisme makronutrien, khususnya lipid, masih belum dapat disingkirkan.

Uji *one-way* ANOVA menunjukkan pemberian kuersetin dalam 4 minggu belum memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar VLDL serum, sehingga perlu dilihat pengaruh durasi perlakuan yang lebih lama terhadap kadar VLDL serum tikus DM yang diinduksi dengan STZ-nikotinamida. Penelitian Juźwiak *et al.* (2005) menunjukkan pemberian kuersetin selama 12 minggu pada kelinci yang mendapat diet tinggi lemak memiliki kadar *very low density lipoprotein* (VLDL) yang lebih rendah dari kelompok

kontrol, namun belum mencapai kadar VLDL pada kelinci yang mendapat pakan standar. Penelitian yang sama juga menunjukkan bahwa pemberian kuersetin selama 4 minggu belum dapat menurunkan kadar VLDL serum pada kelinci yang mendapat diet tinggi lemak.

Walaupun seluruh kelompok menunjukkan kadar VLDL dalam rentang rendah-normal, namun kadar VLDL pada kelompok tikus DM yang mendapat kuersetin 5 mg/kgBB, kuersetin 80 mg/kgBB, kombinasi kuersetin 5 mg/kgBB-glibenklamid, dan kombinasi kuersetin 80 mg/kgBB-glibenklamid menunjukkan kadar yang mendekati nilai kelompok tikus normal yang mendapat plasebo. Hal ini mungkin mengindikasikan potensi kuersetin dalam mempengaruhi kadar VLDL puasa serum. Efek kuersetin mungkin disebabkan aktivasi enzim-enzim mikrosomal akibat peningkatan kadar sitokrom P450 hepar. Sitokrom P450 terlibat dalam aktivitas 7 α -hidroksilase yang berperan dalam metabolisme kolesterol dalam mengkonversi kolesterol menjadi asam empedu (Juźwiak *et al.* 2005). Kuersetin juga dapat menurunkan produksi VLDL di hepatosit tikus. Kuersetin dapat menghambat sintesis asam lemak dan trigliserida *de novo* dalam jangka pendek dengan mempengaruhi asetil-KoA karboksilase dan diasilgliserol asiltransferase (Gnoni *et al.*, 2009). Kuersetin bekerja dengan menurunkan peroksidasi lipid sehingga meningkatkan aktivitas lesitin kolesterol asil transferase (Prince *and* Sathya, 2010). Kuersetin tampaknya bekerja secara tidak langsung dalam mempengaruhi kadar VLDL dengan melindunginya dari proses oksidatif sehingga dapat dikenali oleh sel target. Kemungkinan lainnya adalah peran kuersetin dalam menurunkan aktivitas HMG-KoA reduktase sehingga menurunkan sintesis kolesterol. Kuersetin juga mempengaruhi absorpsi kolesterol, pembentukan dan sekresi trigliserida di hepar, serta menghambat fosfodiesterase di jaringan lemak dan hepar (Seiva *et al.*, 2012).

Kelompok-kelompok yang mendapat kombinasi kuersetin-glibenklamid menunjukkan pola yang sama dengan kelompok-kelompok yang hanya mendapat kuersetin. Walaupun menunjukkan pola yang sama, namun tidak terdapat perbedaan bermakna antar kedua jenis perlakuan. Tampaknya kombinasi kuersetin-glibenklamid tidak lebih baik dari kuersetin saja dalam mempengaruhi kadar VLDL. Dari pola ini juga terlihat bahwa kelompok kuersetin 20 mg/kgBB dengan atau tanpa kombinasi dengan glibenklamid memiliki kadar VLDL puasa yang sama dengan kelompok tikus DM yang mendapat plasebo. Hal ini mungkin menunjukkan kuersetin dengan dosis ini belum mencukupi untuk mempengaruhi kadar VLDL puasa dalam durasi 4 minggu. Kemungkinan kadar kuersetin yang optimal dalam dara belum tercapai dengan dosis ini. Kemungkinan lain adalah durasi 4 minggu belum cukup untuk mempengaruhi kadar VLDL puasa.

8.5. Kadar Lipoprotein Lipase Jaringan Otot Rangka

Ekspresi LPL pada berbagai jaringan tikus cukup beragam, dengan kadar tertinggi ditemukan pada jantung (4.757 ng/g jaringan) diikuti dengan jaringan adiposa (4.170 ng/g jaringan). Jaringan lain yang juga mengekspresikan LPL dalam kadar yang tinggi adalah *m. soleus*, yaitu 3.519 ng/g jaringan (Bergö *et al.*, 1996). Hasil penelitian ini juga menemukan kadar LPL pada *m. soleus* yang mendekati nilai pada penelitian Bergö *et al.*, yaitu 3.704,83 ng/g jaringan.

Kadar LPL pada kelompok tikus DM yang mendapat plasebo 9,29% lebih rendah dari kelompok tikus normal yang mendapat plasebo. Hal ini dapat disebabkan oleh penurunan sekresi insulin akibat rusaknya sel β pankreas oleh streptozotocin. Insulin meningkatkan transkripsi LPL (Unal *et al.*, 2008). Penurunan kadar insulin dalam darah akan menurunkan ekspresi LPL di jaringan, namun karena penelitian ini tidak memeriksa kadar insulin darah maka adanya penurunan kadar insulin darah tidak dapat dipastikan.

Seluruh kelompok perlakuan memiliki kadar LPL yang lebih tinggi dari kelompok tikus normal dan DM yang mendapat plasebo, namun hanya 2 kelompok yang memiliki kadar LPL mendekati nilai normal, yaitu kelompok kuersetin 5 mg/kgBB dan kombinasi kuersetin 5mg/kgBB-glibenklamid. Kuersetin tampaknya meningkatkan ekspresi LPL di jaringan dengan meningkatkan transkripsinya (de Boer *et al.*, 2006). Di antara kedua kelompok, kadar LPL pada kelompok kombinasi lebih tinggi dari kelompok kuersetin 5 mg/kgBB. Perbedaan ini mungkin disebabkan oleh kemampuan kuersetin dan insulin dalam meningkatkan transkripsi LPL. Peran insulin ini dapat terjadi karena peningkatan sekresi insulin oleh glibenklamid.

Lima kelompok lainnya juga menunjukkan kadar LPL yang lebih tinggi dari tikus normal dan DM yang mendapat plasebo. Kadar LPL pada kelima kelompok ini jauh lebih tinggi dari kedua kelompok plasebo. Ekspresi LPL yang berlebihan dapat menurunkan kadar trigliserida, kolesterol, dan *low density lipoprotein* (LDL) sehingga memperbaiki aterosklerosis (Yagyu *et al.*, 1999; Pulawa *et al.*, 2007). Di sisi lain, ekspresi yang berlebihan ini juga dapat menyebabkan resistansi insulin akibat peningkatan sintesis trigliserida (Kim *et al.*, 2001; Weinstock *et al.*, 1997). Tampaknya hal inilah yang menyebabkan kelompok kuersetin 20 mg/kgBB mengalami peningkatan kadar GDP.

Kadar LPL kelompok-kelompok yang hanya mendapat kuersetin menunjukkan pola yang sama dengan kelompok-kelompok yang mendapat kombinasi kuersetin-glibenklamid, namun kadar LPL pada kelompok-kelompok kombinasi lebih tinggi dari kelompok-kelompok yang hanya mendapat kuersetin. Hal ini mungkin disebabkan oleh efek glibenklamid dalam meningkatkan sekresi insulin sehingga meningkatkan transkripsi LPL. Glibenklamid dan kuersetin tampaknya dapat bersinergi dalam meregulasi transkripsi LPL di jaringan otot rangka.

Penelitian de Boer et al. (2006) menunjukkan pemberian kuersetin dengan dosis yang setara dengan 500 mg/kgBB selama 41 minggu dapat meningkatkan ekspresi LPL di jaringan paru, namun perbedaan yang signifikan tidak ditemukan pada penelitian ini, kemungkinan karena durasi perlakuan yang lebih singkat dan dosis yang lebih kecil.

Uji korelasi kadar LPL *m. soleus* dan kadar VLDL serum menunjukkan kadar VLDL berbanding lurus dengan kadar LPL, namun korelasinya sangat lemah dan tidak bermakna. Hasil ini tidak sesuai dengan teori yang dikenal. Secara teoretis, peningkatan ekspresi LPL akan meningkatkan hidrolisis trigliserida pada kilomikron dan VLDL dalam darah sehingga menurunkan kadarnya. Gliserol dan asam lemak hasil hidrolisis ini digunakan sebagai sumber energi bagi jaringan otot rangka (Murray *et al.*, 2009). Kemungkinan terdapat faktor lain yang mempengaruhi kadar VLDL, seperti perubahan rasio LPL aktif dan inaktif pada keadaan puasa. Saat berpuasa, LPL yang baru disintesis tidak dapat menjadi aktif atau kehilangan aktivitasnya (Bergö *et al.*, 1996), namun massa enzim tidak mengalami perubahan (Doolittle *et al.*, 1990). Pemeriksaan LPL pada penelitian ini tidak membedakan ekspresi LPL bentuk aktif dan bentuk inaktif, serta tidak mengukur aktivitas enzim, oleh karena itu peranan faktor ini tidak dapat dipastikan. Kemungkinan lain adalah pengaruh ekspresi LPL di jaringan lain seperti jaringan adiposa dan otot jantung. Penelitian Weinstock *et al.* (1997) menunjukkan bahwa rasio LPL jaringan otot dan jaringan adiposa memegang peranan dalam pengaturan metabolisme trigliserida dan asam lemak, namun peranan faktor ini juga tidak dapat dipastikan karena penelitian ini hanya memeriksa kadar LPL di jaringan otot rangka.

Bab 9. Kesimpulan dan Saran

9.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Kadar *very low density lipoprotein* (VLDL) serum tikus Wistar model DM tipe 2 lebih rendah pada pemberian kombinasi kuersetin dosis 5 dan 20 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB dibanding kuersetin dosis 5 dan 20 mg/kgBB.
 - a. Kuersetin dosis 5 dan 20 mg/kgBB dengan dan tanpa kombinasi memiliki kadar VLDL yang mendekati kadar VLDL tikus normal yang mendapat plasebo.
2. Ekspresi lipoprotein lipase (LPL) di jaringan otot rangka tikus Wistar model DM tipe 2 lebih tinggi pada pemberian kombinasi kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB dibanding kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kg berat badan (BB), dan plasebo.
 - a. Kuersetin dosis 5 mg/kgBB dengan dan tanpa kombinasi memiliki kadar LPL yang mendekati tikus normal yang mendapat plasebo.
3. Kadar VLDL serum berbanding lurus dengan ekspresi LPL di jaringan otot rangka tikus Wistar model DM tipe 2 setelah pemberian kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB, kombinasi kuersetin dosis 5, 20, 80 mg/kgBB-glibenklamid 5 mg/kgBB, dan glibenklamid 5 mg/kgBB.

9.2. Saran

1. Perlu dilihat efek pemberian kuersetin dalam durasi yang lebih panjang terhadap kadar VLDL serum dan ekspresi LPL di jaringan otot rangka.
2. Perlu kajian lebih lanjut mengenai pengaruh kuersetin terhadap progresi resistansi insulin.

Bab 10. Personalia Penelitian

1. Ketua Peneliti

- | | |
|----------------------------------|--------------------------------|
| a. Nama Lengkap | : dr. Sylvia Rianissa Putri |
| b. Jenis Kelamin | : P |
| c. NIP | : 198512202009122002 |
| d. Disiplin Ilmu | : Pendidikan Dokter |
| e. Pangkat/Golongan | : Penata Muda Tingkat I/III B |
| f. Jabatan Fungsional/Struktural | : Asisten Ahli |
| g. Fakultas/Jurusan | : Kedokteran/Pendidikan Dokter |
| h. Waktu Penelitian | : Mei – Desember 2013 |

Bab 11. Anggaran Biaya Penelitian

1. Peralatan dan Bahan

Rat lipoprotein lipase ELISA kit : Rp 10.000.000,00

JUMLAH TOTAL ANGGARAN YANG DIPERLUKAN : Rp. 10.000.000,00
(Sepuluh Juta Rupiah)

Daftar Pustaka

- Abou-Seif, M.A., Youssef, A., 2004. Evaluation of somebiochemical changes in diabetic patients. *Clin. Chim. Acta* 346: 161-170.
- Aguirre, L., Arias, N., Macarulla, M.T., Gracia, A., Portillo, M.P., 2011. Beneficial effects of quercetin on obesity and diabetes. *Open Nutraceuticals J.* 4: 189-198.
- Ahmad, S., Hartono, B., Kusumobroto, B.S., Sugito, Sunaryadi, Kurniasih, N., Hardhana, B, Manullang, E., Anam, M.S., Wardah, Susanti, M.I., Supriyono, Kumbini, D.R., Istiqomah, Sagitarina, R., Sariyono, Tambunan, S., 2007. Profil Kesehatan Indonesia 2005. Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Akbarzadeh, A., Norouzian, D., Mehrabi, M.R., Jamshidi, Sh., Farhangi, A., Allah Verdi, A., Mofidian, S.M.A., Lame Rad, B., 2007. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian J. Clin. Biochem.* 22 (2): 60-64.
- American Diabetes Association, 2012. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 35 (Suppl. 1): S64-S71.
- Babujanarthanam, R., Kavitha, P., Rao, U.S.M., Pandian, M.R., 2011. Quercitrin a bioflavonoid improves the antioxidant status in streptozotocin induced diabetic rat tissues. *Mol. Cell. Biochem.* 358: 121-129.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008. Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2007: Laporan Nasional 2007. Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Barik, R., Jain, S., Qwatra, D., Joshi, A., Tripathi, G.S., Goyal, R., 2008. Antidiabetic activity of aqueous root extract of *Ichnocarpus frutescens* in streptozotocin-nicotinamide induced type-II diabetes in rats. *Indian J. Pharmacol.* 40: 19-22.
- Bennet, R.A., Pegg, A.E., 1981. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res.* 41: 2786-2790.
- Bergö, M., Olivecrona, G., Olivecrona, T., 1996. Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increases on fasting. *Biochem. J.* 313: 893-898.
- Bolzan, A.D., Bianchi, M.S., 2002. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat. Res.* 512: 121-134.
- Bonow, R.O., Mann, D.L., Zipes, D.P., Libby, P., 2012. Braunwald's Heart Disease: a textbook of cardiovascular medicine. 9th ed. Elsevier, Philadelphia.
- Burden, D.W., 2012. Guide to the disruption of biological samples 2012. *Random Primers* 12: 1-25.
- Catapano, A.L., 1982. Apolipoprotein C-II and lipoprotein lipase activity. *Ric. Clin. Lab.* 12: 35-40.
- Chaillou, L.L., Nazareno, M. A., 2006. New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 54: 8397-8402.

- Cockram, C.S., 2000. The epidemiology of diabetes mellitus in the Asia-Pacific region. *HKMJ* 6 (1): 43-52.
- Conn, P.M., 2008. Sourcebook of models for biomedical research. Humana Press, New Jersey.
- Coppack, S.W., Persson, M., Judd, R.L., Miles, J.M., 1999. Glycerol and nonesterified fatty acid metabolism in human muscle and adipose tissue in vivo. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 276: E233-E240.
- Cortright, R.N., Muoio, D.M., Dohm, G.L., 1997. Skeletal muscle lipid metabolism: a frontier for new insights into fuel homeostasis. *Nutr. Biochem.* 8: 228-245.
- Dean, L., McEntyre, J., 2004. The genetic landscape of diabetes. National Center for Biotechnology Information, Bethesda.
- de Boer, V.C.J., Dihal, A.A., van der Woude, H., Arts, I.C.W., Wolfram, S., Alink, G.M., Rietjens, I.M.C.M., Keijer, J., Hollman, P.C.H., 2005. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *J. Nutr.* 135: 1718-1725.
- de Boer, V.C.J., van Schothorst, E.M., Dihal, A.A., van der Woude, H., Arts, I.C.W., Rietjens, I.M.C.M., Hollman, P.C.H., Keijer, J., 2006. Chronic quercetin exposure affects fatty acid catabolism in rat lung. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 2847-2858.
- Devlin, T.M., 2006. Textbook of biochemistry with clinical correlations. 6th ed. Wiley-Liss, Hoboken.
- Doolittle, M.H., Ben-Zeev, O., Elovson, J., Martin, D., Kirchgessner, T.G., 1990. The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation. *J. Biol. Chem.* 265 (8): 4570-4577.
- Egert, S., Wolfram, S., Bosy-Westphal, A., Boesch-Saadatmandi, C.B., Wagner, A.E., Frank, J., Rimbach, G., Mueller, M.J., 2008. Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. *J. Nutr.* 138: 1615-1621.
- Eisenberg, S., Sehayek, E., Olivecrona, T., Vlodavsky, I., 1992. Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparin sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *J. Clin. Invest.* 90: 2013-2021.
- Fauci, A.S., Braunwald, E., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L., Loscalzo, J. (Eds.), 2008. Harrison's principle of internal medicine. 17th ed. The McGraw-Hill Companies, Inc, New York.
- Fondjo, F.A., Kamgang, R., Oyono, J.L.E., Yonkeu, J.N., 2012. Anti-dyslipidemic and antioxidant potentials of methanol extract of *Kalanchoe crenata* whole plant in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Trop. J. Pharm. Res.* 11 (5): 767-775.
- Gnoni, G.V., Paglialonga, G., Siculella, L., 2009. Quercetin inhibits fatty acid and triacylglycerol synthesis in rat-liver cells. *Eur. J. Clin.* 39 (9): 761-768.
- Goldberg, I.J., 2001. Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. *The J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (3): 965-971.

- Heltianu, C., Guja, C., 2011. Role of nitric oxide synthase family in diabetic neuropathy. *J. Diabetes Metab.* 8 (5): 1-7.
- Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W., 2000. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80 (7): 1081-1093.
- Hosokawa, M., Dolci, W., Thorens, B., 2001. Differential sensitivity of GUT1- and GLUT2-expressing β cells to streptozotocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 1114-1117.
- Howard, B.V., 1987. Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *J. Lipid Res.* 28: 613-628.
- Jeong, S.M., Kang, M.J., Choi, H.N., Kim, J.H., Kim, J.I., 2012. Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice. *Nut. Res. Pract.* 6 (3): 201-207.
- Jin, F., Nieman, D.C., Shanely, R.A., 2010. The variable plasma quercetin response to 12-week quercetin supplementation in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64: 692-697.
- Juźwiak, S., Wójcicki, J., Mokrzycki, K., Marchlewicz, M., Białecka, M., Wenda-Różewicka, L., Gawrońska-Szklarz, B., Drożdżik, M., 2005. Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits. *Pharmacol. Rep.* 57: 604-609.
- Katzung, B.G., 2004. Basic and clinical pharmacology. 9th ed. The McGraw-Hill Companies, Inc, New York.
- Kiens, B., Lithell, H., Mikines, K.J., Richter, E.A., 1989. Effects of insulin and exercise on muscle lipoprotein lipase activity in man and its relation to insulin action. *J. Clin. Invest.* 84 (4): 1124–9.
- Kim, J.K., Fillmore, J.J., Chen, Y., Yu, C., Moore, I.K., Pypaert, M., Lutz, E.P., Kako, Y., Velez-Carrasco, W., Goldberg, I.J., Breslow, J.L., Shulman, G.I., 2001. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7522-7527.
- Kirchgessner, T.G., LeBoeuf, R.C., Langner, C.A., Zollman, S., Chang, C.H., Taylor, B.A., Schotz, M.C., Gordon, J.I., Lusis, A.J., 1989. Genetic and developmental regulation of the lipoprotein lipase gene: loci both distal and proximal to the lipoprotein lipase structural gene control enzyme expression. *J. Biol. Chem.* 264: 1473-1482.
- Kiss, L., Szabó, C., 2005. The pathogenesis of diabetic complications: the role of DNA injury and poly(ADP-ribose) polymerase activation in peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100 (Suppl. I): 29-37.
- Kleemann, R., Verschuren, L., Morrison, M., Zadelaar, S., van Erk, M.J., Wielinga, P.Y., Kooistra T., 2011. Anti-inflammatory, anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models. *Atherosclerosis* 218: 44-52.
- Kovář, J., Fejfarová, V., Pelikánová, T., Poledne, R., 2004. Hyperglycemia downregulates total lipoprotein lipase activity in humans. *Physiol. Res.* 53: 61-68.

- Linder, C., 1976. Lipoprotein lipase and uptake of chylomicron triglyceride by skeletal muscle of rats. *Am. J. Physiol.* 231: 860-864.
- Machha, A., Achike, F.I., Mustafa, A.M., Mustafa, M.R., 2007. Quercetin, a flavonoid antioxidant, modulates endothelium-derived nitric oxide bioavailability in diabetic rat aortas. *Nitric Oxide* 16: 442-447.
- Maciel, R.M., Costa, M.M., Martins, D.B., França, R.T., Schmatz, R., Graça, D.L., Duarte, M.M.M.F., Danesi, C.C., Mazzanti, C.M., Schetinger, M.R.C., Paim, F.C., Palma, H.E., Abdala, F.H., Stefanello, N., Zimpel, C.K., Felin, D.V., Lopes, S.T.A., 2013. Antioxidant and anti-inflammatory effects of quercetin in functional and morphological alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. *Res. Vet. Sci.* Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.028>. Accessed at 7 Aug 2013.
- Mackie, B.G., Dudley, G.A., Kaciuba-Uscilko, H., Terjung, R.L., 1980. Uptake of chylomicron triglycerides by contracting skeletal muscle in rats. *J. Appl. Physiol.* 49: 851-855.
- Manach, C., Donovan, J.L., 2004. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic. Res.* 38 (8): 771-785.
- Mangels, A.R., Holdem, J.M., Beecher, G.R., Forman, M.R., Lanza, E., 1993. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. *J. Am. Diet Assoc.*, 93 (3): 284-96
- Metzger, B.E., Gabbe, S.G., Persson, B., Buchanan, T.A., Catalano, P.A., Damm, P., Dyer, A.R., Leiva, A., Hod, M., Kitzmiller, J.L., Lowe, L.P., McIntyre, H.D., Oats J.J., Omori, Y., Schmidt, M.I., 2010. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care* 33: 676-682.
- Mooney, R.A., Senn, J., Cameron, S., 2001. Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associated with and inhibit the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 276 (28): 25889-25893.
- Mughal, M.A., Aamir, K., Ali, M., Maheri, W.M., Jan, M., 1999. The effects of glibenclamide on serum lipids and lipoprotein in type II non-insulin dependent diabetes mellitus. *J. Pak. Med. Assoc.* 49 (4): 89-92.
- Murray, R.K., Bender, D.A., Botham, K.M., Kennelly, P.J., Rodwell, V.W., Weil, P.A., 2009. Harper's illustrated biochemistry. 28th ed. The McGraw-Hill Companies, Inc, New York.
- Murakami, A., Ashida, H., Terao, J., 2008. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett.* 269: 315-325.
- Nanjundan, P.K., Arunachalam, A., Thakur, R.S., 2009. Antinociceptive property of *Trigonella foenum graecum* (fenugreek seeds) in high fat diet-fed/low dose streptozotocin induced diabetic neuropathy in rats. *Pharmacologyonline* 2: 24-36.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2008. Lehninger principles of biochemistry. 5th ed. W.H. Freeman and Company, New York.

- Pacher, P., Obrosova, G., Mabley, J.G., Szabó, C., 2005. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications: emerging new therapeutical strategies. *Curr. Med. Chem.* 12 (3); 267-275.
- Perkumpulan Endokrinologi Indonesia, 2011. Konsensus pengelolaan dan pencegahan diabetes melitus tipe 2 di Indonesia. Perkeni, Jakarta.
- Prince, P.S.M., Sathya, B., 2010. Pretreatment with quercetin ameliorates lipids, lipoproteins and marker enzymes of lipid metabolism in isoproterenol treated carditoxic male Wistar rats. *Eur. J. Pharmacol.* 635: 142-148.
- Pulawa, L.K., Jensen, D.R., Coates, A., Eckel, R.H., 2007. Reduction of plasma triglycerides in apolipoprotein C-II transgenic mice overexpressing lipoprotein lipase in muscle. *J. Lipid Res.* 48: 145-151.
- Pykälistö, O.J., Smith, P.H., Brunzell, J.D., 1975. Determinants of human adipose tissue lipoprotein lipase: effect of diabetes and obesity on basal- and diet-induced activity. *J. Clin. Invest.* 56: 1108-1117.
- Ranganathan, G., Song, W., Dean, N., Monia, B., Barger, S.W., Kern, P.A., 2002. Regulation of lipoprotein lipase by protein kinase C α in 3T3-F442A adipocytes. *J. Biol. Chem.* 277 (41): 38669-38675.
- Ren, J., Grundy, S.M., Liu, J., Wang, W., Wang, M., Sun, J., Liu, J., Li, Y., Wu, Z., Zhao, D., 2010. Long-term coronary heart disease risk associated with very-low-density lipoprotein cholesterol in Chinese: the results of a 15-year Chinese Multi-Provincial Cohort Study (CMCS). *Atherosclerosis* 211: 327-332.
- Rui, L.Y., Yuan, M.S., Frantz, D., Shoelson, S., 2002. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J. Biol. Chem.* 277 (44): 42394-42398.
- Sawula, W., Banecka-Majkutewicz, Z., Kadziński, L., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Węgrzyn, G., Nyka, W., Banecki, B., 2008. Improved HPLC method for total plasma homocysteine detection and quantification. *Acta Biochim. Pol.* 55 (1); 119-125.
- Sevia, F.R.F., Chuffa, L.G.A., Braga, C.P., Amorim, J.P.A., Fernandes, A.A.H., 2012. Quercetin ameliorates glucose and lipid metabolism and improves antioxidant status in postnatally monosodium glutamate-induced metabolic alterations. *Food Chem. Toxicol.* 50: 3556-3561.
- Shaw, J.E., Sicree, R.A., Zimmet, P.Z., 2010 Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 87: 4-14.
- Sheela, N., Jose, M.A., Sathiyamurthy, D., Kumar, B.N., 2013. Effect of silymarin on streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic nephropathy in rats. *IJKD* 7: 117-123.

- Smith, J.B., Mangkoewidjojo, S., 1988. *Pemeliharaan, pembiakan dan penggunaan hewan percobaan di daerah tropis*. UI Press, Jakarta.
- Tavangar, K., Murata, Y., Pedersen, M.E., Goers, J.F., Hoffman, A.R., Kraemer, F.B., 1992. Regulation of lipoprotein lipase in diabetic rat. *J. Clin. Invest.* 90: 1672-1678.
- Terjung, R.L., Budohoski, L., Nazar, K., Kobryn, A., Kaciuba-Uscilko, H., 1982. Chylomicron triglyceride metabolism in resting and exercising fed dogs. *J. Appl. Physiol.* 52: 815-820.
- Unal, R., Pokrovskaya, I., Tripathi, P., Monia, B.P., Kern, P.A., Ranganathan, G., 2008. Translational regulation of lipoprotein lipase in adipocytes: depletion of cellular protein kinase C α activates binding of the C subunit of protein kinase A to the 3'-untranslated region of the lipoprotein lipase mRNA. *Biochem. J.* 413 (2): 315-322.
- Unger, R.H., Foster, D.W., 1998. Diabetes mellitus. In: Wilson, J.D. (ed.), Williams' Textbook of Endocrinology, 9th ed. WB Saunders, Philadelphia, pp.973-1059.
- van der Woude, H., Boersma, M.G., Vervoort, J., Rietjens, I.M., 2004. Identification of 14 quercetin phase II mono- and mixed conjugates and their formation by rat and human phase II in vitro model systems. *Chem. Res. Toxicol.* 17: 1520-1530.
- van Hall, G., Sacchetti, M., R  degran, G., Saltin, B., 2002. Human skeletal muscle fatty acid and glycerol metabolism during rest, exercise and recovery. *J. Physiol.* 543: 1047-1058.
- Wang, H., Eckel, R.H., 2009. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297: E271-E288.
- Watkins, P.J., 2003. ABC of Diabetes. 5th ed. BMJ Publishing Group LTD, London.
- Weinstock, P.H., Levak-Frank, S., Hudgins, L.C., Radner, H., Friedman, J.M., Zechner, R., Breslow, J.L., 1997. Lipoprotein lipase controls fatty acid entry into adipose tissue, but fat mass is preserved by endogenous synthesis in mice deficient in adipose tissue lipoprotein lipase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 10261-10266.
- Wion, K.L., Kirchgessner, T.G., Lusi, A.J., Schotz, M.C., Lawn, R.M., 1987. Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence. *Science* 235: 1638-1641.
- Wolfsdorf, C.J., Daneman, D., Rosenbloom, L., 2007. Diabetic ketoacidosis. *Pediatr. Diabetes* 8: 28-43.

- Wong, H., Davis, R.C., Thuren, T., Goers, J.W., Nikazy, J., Waite, M., Schotz, M.C., 1994. Lipoprotein lipase domain function. *J. Biol. Chem.* 269: 10319-10323.
- Wong, H., Yang, D., Hill, J.S., Davis, R.C., Nikazy, J., Schotz, M.C., 1997. A molecular biology-based approach to resolve the subunit orientation of lipoprotein lipase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5594-5598.
- World Health Organization, 2011. Global status report on noncommunicable diseases 2010. World Health Organization, Geneva.
- Yagyu, H., Ishibashi, S., Chen, Z., Osuga, J., Okazaki, M., Perrey, S., Kitamine, T., Shimada, M., Ohashi, K., Harada, K., Shionoiri, F., Yahagi, N., Gotoda, T., Yazaki, Y., Yamada, N., 1999. Overexpressed lipoprotein lipase in atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *J. Lipid Res.* 40: 1677-1685.
- Ying, H.Z., Liu, Y.H., Yu, B., Wang, Z.Y., Zang, J.N., Yu, C.H., 2013. Dietary quercetin ameliorates nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fat diet in gerbils. *Food Chem. Toxicol.* 52: 53-60.
- Zhou, S.S., Li, D., Sun, W.P., Guo, M., Lun, Y.Z., Zhou, Y.M., Xiao F.C., Jing, L.X., Sun, S.X., Zhang L.B., Luo, N., Bian, F.N., Zou, W., Dong, L.B., Zhao, Z.G., Li, S.F., Gong X.J., Yu, Z.G., Sun, C.B., Zheng C.L., Jiang, D.J., Li, Z.N., 2009. Nicotinamide overload may play a role in the development of type 2 diabetes. *World J. Gastroenterol.* 15: 5674-5684.